

14

T.000-106

UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
AREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOCROMO C
EN *Kluyveromyces lactis*

Memoria presentada para aspirar al grado de
Doctora en Biología, por María Angeles Freire Picos

La Coruña, Noviembre de 1993

El presente trabajo: **ESTUDIO DE LA EXPRESION GENICA DE CITOCROMO C EN *Kluyveromyces lactis***, presentado por Dña. María Angeles Freire Picos para aspirar al grado de Doctora en Biología, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de La Coruña.

Revisado el texto, estoy conforme con su presentación para ser juzgado.

La Coruña, 21 de Septiembre de 1993



VºBº

LA DIRECTORA DEL TRABAJO

Dra. Mª Esperanza Cerdán Villanueva
Prof. de Bioquímica y Biología Molecular.

La autora de este trabajo ha disfrutado durante su realización de una beca de La Diputación de La Coruña en 1990 y de la Xunta de Galicia, 1991-1993.

La financiación del desarrollo experimental ha sido posible gracias a la Fundación Volkswagen y al proyecto DGICYT (PB90-0996).

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos sin cuya inestimable ayuda no habría sido posible el presente trabajo y en especial:

A la Dra. M^a Esperanza Cerdán Villanueva por haber dirigido la realización del presente trabajo.

A la Dra. Ana María Rodríguez Torres por su inestimable ayuda en la secuenciación.

A los doctores C.P. Hollenberg, K.D. Breunig y R. Zitomer por su participación e interés en el proyecto.

A mis compañeras Elvira Ramil, Esther Rodríguez, Belén Tizón e Isabel González por lo mucho que me ayudaron en la composición de esta tesis y, sobre todo, por su colaboración durante todo este tiempo y su amistad.

Al resto de compañeros no sólo del laboratorio de Bioquímica sino también de Genética Microbiología y Fisiología Vegetal por su ayuda su amistad y su apoyo a lo largo de estos años.

Dedico este trabajo a mis padres

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN

- Consideraciones sobre el metabolismo respiro-fermentativo en levaduras....	1
- Inactivación por glucosa/represión catabólica.....	9
- Interacción núcleo mitocondria.....	10
- Regulación transcripcional de citocromos en levaduras.....	13
- Regulación no transcripcional de citocromos.....	22

OBJETIVOS.....	28
-----------------------	-----------

MATERIAL Y MÉTODOS

- Líneas celulares.....	29
- Plásmidos.....	30
- Medios de cultivo.....	35
- Crecimiento de los cultivos.....	38
- Obtención de ácidos nucleicos.....	39
- Medida de la concentración de ácidos nucleicos.....	45
- Técnicas de modificación del DNA.....	45
- Transformación de bacterias.....	47
- Transformación de levaduras.....	48
- Técnicas de electroforesis.....	48
- Aislamiento de fragmentos de DNA.....	51
- Southern blot.....	52
- Northern blot.....	53
- Cuantificación de los niveles de expresión.....	55
- Puntos de inicio de la transcripción por S1.....	55
- Secuenciación.....	55
- Programas de ordenador.....	58

RESULTADOS

- Clonación del gen <i>KICYC1</i>	59
- Homologías del gen clonado con <i>CYC1</i> de <i>S. cerevisiae</i>	61
- Origen genómico del clon.....	62
- Secuenciación del gen <i>KICYC1</i>	63
- Estudio del uso de codones en <i>K. lactis</i>	67
- Estudio de la secuencia de la región promotora del gen.....	78
- Análisis de los mensajeros generados por <i>KICYC1</i>	80
- Expresión del gen <i>KICYC1</i>	85
- Expresión heteróloga.....	90
- Expresión en cepas <i>RAG</i> ⁺ y <i>RAG</i> ⁻	102

DISCUSIÓN

- Clonación del gen citocromo <i>c</i> de la levadura <i>Kluyveromyces lactis</i>	108
- Análisis del uso de codones en <i>K. lactis</i> y genes citocromo <i>c</i> de levaduras..	108
- Regulación transcripcional de <i>KICYC1</i>	109
- El efecto <i>Crabtree</i> en <i>K. lactis</i>	110
- Hemo como señal reguladora.....	113
- Efecto de la carencia de aminoácidos sobre la expresión de citocromo <i>c</i>	113
- Efecto de las mutaciones <i>rox</i> sobre la expresión de <i>KICYC1</i>	114
- Expresión de <i>KICYC1</i> en mutantes <i>RAG</i>	115

CONCLUSIONES.....	117
-------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA.....	119
-------------------	-----

APÉNDICE I- Construcciones plasmídicas.....	136
---	-----

APÉNDICE II- Reactivos utilizados.....	138
--	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	2	Figura 20.....	84
Figura 2.....	8	Figura 21.....	86
Figura 3.....	20	Figura 22.....	88
Figura 4.....	31	Figura 23.....	89
Figura 5.....	32	Figura 24.....	91
Figura 6.....	33	Figura 25.....	92
Figura 7.....	34	Figura 26.....	94
Figura 8.....	44	Figura 27.....	95
Figura 9.....	60	Figura 28.....	96
Figura 10.....	61	Figura 29.....	98
Figura 11.....	62	Figura 30.....	99
Figura 12.....	63	Figura 31.....	100
Figura 13.....	64	Figura 32.....	101
Figura 14.....	66	Figura 33.....	102
Figura 15.....	78	Figura 34.....	103
Figura 16.....	79	Figura 35.....	104
Figura 17.....	81	Figura 36.....	105
Figura 18.....	82	Figura 37.....	116
Figura 19.....	83		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.....	5
Tabla II.....	67
Tabla III.....	70
Tabla IV.....	71
Tabla V.....	73
Tabla VI.....	75
Tabla VII.....	77

ABREVIATURAS

A₆₀₀: absorbancia a 600 nm

AMPc: adenosina-3', 5'-fosfato cíclico

APS: persulfato amónico

DEPC: dietil pirocarbonato

dATP: desoxiadenosín-trifosfato

dCTP: desoxicitosín-trifosfato

dGTP: desoxiguanosín-trifosfato

dTTP: desoxitimidín-trifosfato

ddATP: didesoxiadenosín-trifosfato

ddCTP: didesoxicitosinosín-trifosfato

ddGTP: didesoxiguanosín-trifosfato

ddTTP: didesoxitimidín-trifosfato

DMSO: dimetil sulfóxido

dNTPs: desoxinucleótidostrifosfato.

ddNTPs: didesoxinucleótidos-trifosfato

DNA: ácido desoxirribonucleico

D.O.: densidad óptica

DTT: ditioneitol

E.D.T.A.: tetra-acetato de etilendiamina

Kb: kilobases

MCS: sitio de clonaje múltiple

min.: minutos

mRNA: RNA mensajero

nm: nanómetro

ORF: pauta abierta de lectura

pb: pares de bases

p/v: peso-volumen

rpm: revoluciones por minuto

seg.: segundos

SDS: dodecil sulfato sódico

TEMED: N,N,N', N'-tetrametiletiléndiamina

UDP: uridina difosfato

UV: ultravioleta

INTRODUCCIÓN

La regulación de la expresión génica es un aspecto fundamental en muchos fenómenos biológicos tales como el crecimiento celular, el desarrollo en los organismos pluricelulares o la respuesta a las condiciones ambientales.

Las levaduras son organismos unicelulares que poseen la compleja maquinaria celular de los eucariotas, presentando la ventaja de tener una organización relativamente simple y una tasa de crecimiento rápido. Históricamente han tenido un gran interés para el hombre, pero fué el desarrollo de las industrias alimentarias, principalmente aquellas encargadas de la producción de bebidas alcohólicas, la razón que llevó al estudio del metabolismo respiro-fermentativo en levaduras. Este interés industrial impulsó el desarrollo de sofisticadas técnicas de manipulación genética que han permitido el aislamiento y la caracterización de muchos genes de levaduras, así como la obtención de mutantes en los que se encuentra afectada la expresión de esos genes.

CONSIDERACIONES SOBRE EL METABOLISMO RESPIRO-FERMENTATIVO EN LEVADURAS

Las levaduras difieren en su forma de obtención de energía. Algunas especies utilizan preferentemente las vías fermentativas mientras que otras son respiradoras. Gancedo y Serrano (1989), hicieron una clasificación de las levaduras considerando el destino del piruvato; en las levaduras que son incapaces de utilizar la glucosa en ausencia de oxígeno, *aerobias obligadas*, todo el piruvato sigue el ciclo de los ácidos tricarboxílicos vía Acetil-CoA. Aquellas en que la glucosa puede utilizarse tanto en condiciones aerobias como anaerobias se clasifican como *anaerobias facultativas*. Estas a su vez pueden subdividirse en levaduras *fermentadoras*, en las que la respiración representa un 10% del catabolismo aerobio de la glucosa y levaduras *respiradoras* si el metabolismo aerobio de la glucosa sigue preferentemente la vía respiratoria.

En la figura 1 se ilustran, de modo sencillo, las rutas metabólicas que pueden utilizar las levaduras para la obtención de energía a partir de diferentes fuentes de carbono; el que sigan preferentemente una vía u otra depende de las características de cada especie o, en su caso, de la existencia de mutaciones que bloqueen alguna ruta. Las levaduras difieren también en su capacidad para la utilización de diversos sustratos como fuente de carbono y energía.

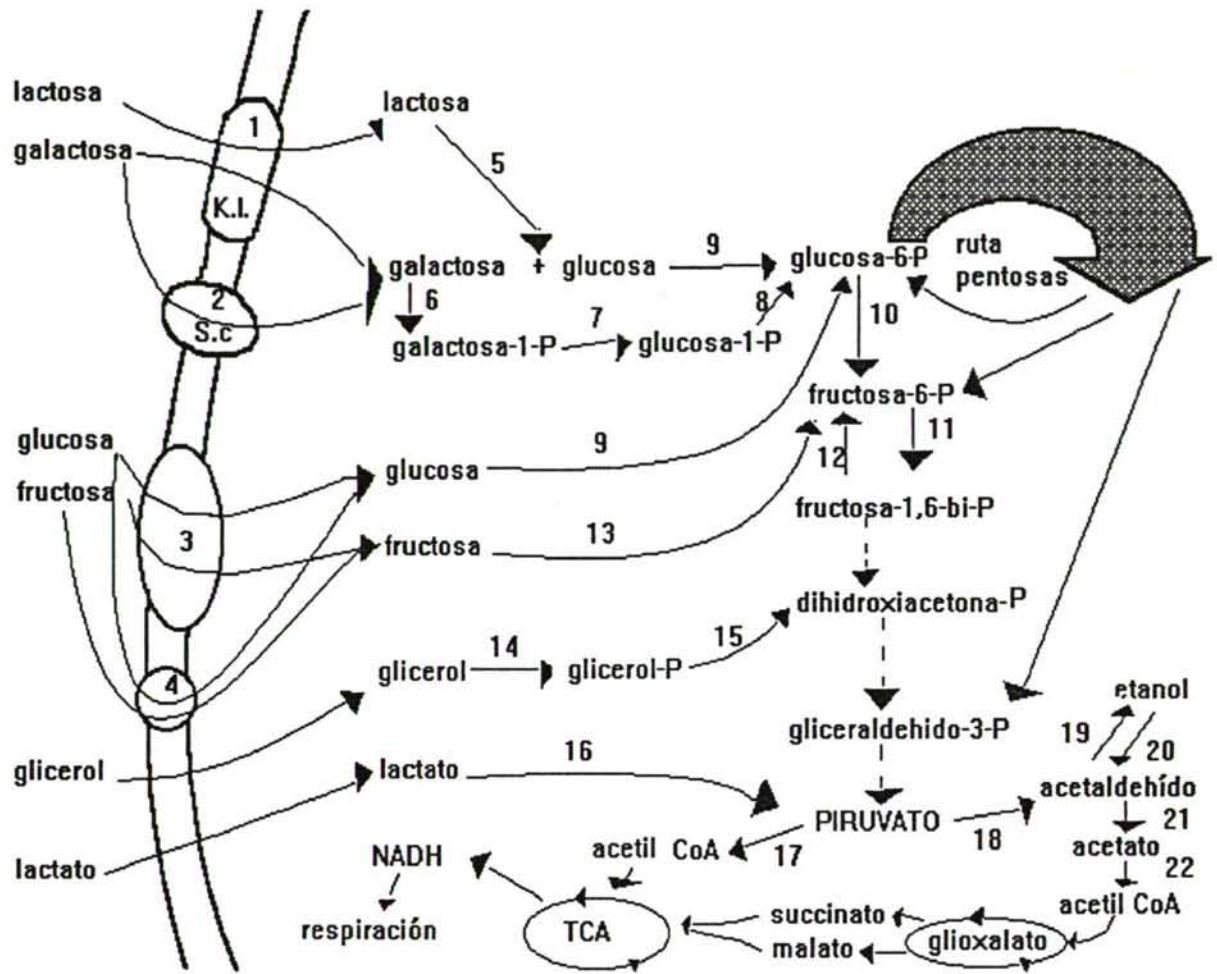


Figura 1. Captación y catabolismo de diferentes compuestos en las levaduras *S. cerevisiae* y *K. lactis*. Para una revisión mas detallada ver Gancedo y Serrano (1989). La utilización de la lactosa, propia de *K. lactis* ha sido descrita por Dickson y Riley (1989), una revisión del sistema *Gal* de *Saccharomyces* puede encontrarse en Fukasawa y Nogi (1989). La función de los genes *RAG1* y *RAG2* de *K. lactis* ha sido descrita por Goffrini y colaboradores (1989); Wésolowski y colaboradores (1992a) *Kl*, *Kluyveromyces lactis*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; 1: lactosa permeasa (*LAC12*); 2: galactosa permeasa (*GAL2*); 3: transportador de glucosa (*RAG1*, homólogo en secuencia al transportador alta afinidad de *S. cerevisiae* codificada por el gen *SNF3*); 4: representa al transportador de glucosa de alta afinidad de *K. lactis* y en general a los varios transportadores de glucosa de *S. cerevisiae*; 5: β -galactosidasa (*LAC4*); *6: galactoquinasa (*GAL1*); 7: Galactosa-1-P uridiltransferasa (*GAL7*) y UDP-Galactosa-4 epimerasa (*GAL10*); 8: fosfoglucomutasa; 9: hexoquinasa PII (*HXKII*); 10: glucosa fosfato isomerasa (*PGL*, su homólogo en *K. lactis* es *RAG2*); 11: fosfofructoquinasa (*PFK1* y *PFK2*); 12: fructosa-1,6-bisfosfatasa (*FBP1*); 13: hexoquinasa; 14: glicerolquinasa; 15: glicerol fosfato-ubiquinona oxidorreductasa; 16: lactato deshidrogenasa (*LDH*); 17: piruvato deshidrogenasa; 18: piruvato descarboxilasa; 19: alcohol deshidrogenasa-1 (*ADH1*); 20: alcohol deshidrogenasa-2 (*ADH2*); 21: aldehído deshidrogenasa; 22: acetil-CoA- sintetasa.

* A partir del punto 6 la nomenclatura de los genes se refiere a la especie *S. cerevisiae*.

Aunque hemos visto que las rutas metabólicas fermentativas y respiratorias pueden co-existir en una misma levadura, los mecanismos que controlan el flujo a través de cada una de ellas no son todavía bien conocidos. Los primeros hallazgos a este respecto provienen de principios de siglo; Pasteur observó que la fermentación de la levadura del pan disminuía en presencia de oxígeno y en 1920 Warburg denominó *efecto Pasteur* al efecto inhibitorio de la respiración sobre la fermentación; un efecto que está asociado al descenso del consumo de azúcares (Alexander y Jeffries, 1990). Se observó también que algunas especies de levaduras capaces de fermentar glucosa, no fermentaban ni galactosa ni determinados disacáridos, aunque podían crecer en ellos utilizando vías no fermentativas; a este fenómeno se le denominó *efecto Kluyver* y está considerado actualmente como un caso extremo de *efecto Pasteur* (Gancedo y Serrano, 1989).

En 1929, Herbert Crabtree descubrió, primero en células tumorales y luego en levaduras, la existencia de fermentación en condiciones aerobias. La fermentación bajo condiciones aerobias, cuando la respiración podría ser posible se denomina *efecto Crabtree* y se describió inicialmente como una inhibición de la respiración causada por la fermentación; el prototipo de levadura *Crabtree* positiva es *S. cerevisiae* y, en los cultivos en fase de crecimiento activo, el efecto más relevante en esta levadura es el *efecto Crabtree* y no el *Pasteur* como inicialmente se había descrito (Alexander y Jeffries, 1990). El efecto *Crabtree* puede definirse también como la producción de etanol bajo condiciones estrictamente aerobias. Aunque inicialmente se asoció con la represión por glucosa de la respiración (Crabtree, 1929; De Deken, 1966a). Estudios posteriores de Alexander y Jeffries (1990) indican que el *efecto Crabtree* parece deberse más bien a una limitada capacidad respiratoria que a una represión específica de la respiración. De hecho, Sierkstra y colaboradores (1992), haciendo un estudio en cultivos continuos de *S. cerevisiae*, con aporte de glucosa constante y a diferentes tasas de dilución, comprobaron que tanto los niveles de mRNA como la actividad enzimática de la invertasa, enzima glucosa-represible, se mantenían incluso cuando las células estaban produciendo etanol; es decir, no apreciaban una represión específica por glucosa en estos cultivos.

Muchas levaduras son capaces de originar mutantes a los que se denomina *petite* por el pequeño tamaño de las colonias que producen al crecer en un medio con glucosa en cantidades limitantes, además estos mutantes no crecen en un medio no fermentable como el glicerol o el lactato. La mayoría de las cepas de levaduras que son *petite* negativas son insensibles a la represión por glucosa de las enzimas respiratorias y no presentan *efecto Crabtree* (De Deken, 1966b). El mismo autor encontró una correlación entre la capacidad de las cepas parentales de crecer bajo condiciones anaerobias y la aparición de la mutación *petite*.

Comparación del metabolismo respiro-fermentativo en *K. lactis* y *S. cerevisiae*.

Desde el punto de vista metabólico, *S. cerevisiae* se clasifica como anaerobia facultativa y como fermentadora aerobia, por el predominio de la fermentación sobre la respiración al crecer en glucosa en condiciones aerobias (De Deken, 1966a; Gancedo y Serrano, 1989). Además, es capaz de soportar deficiencias mitocondriales, lo que se manifiesta fenotípicamente por su crecimiento en forma de colonias de pequeño tamaño denominadas *petite*.

La levadura *K. lactis*, a diferencia de *S. cerevisiae*, es capaz de crecer en lactosa como única fuente de carbono; esta utilización de la lactosa se debe a la combinación de un sistema de transporte para la lactosa y a su capacidad de producción de β -galactosidasa (De Mot, 1984; Chang y Dickson, 1988). El metabolismo respiratorio en condiciones aerobias es elevado, predominando la respiración sobre la fermentación al crecer en un medio con glucosa como fuente de carbono (Gancedo y Serrano, 1989).

K. lactis está clasificada como *petite* negativa (Bulder, 1964), pero ninguna de las correlaciones encontradas entre la mutación *petite* y el metabolismo respiro-fermentativo se cumplen en *K. lactis*. En primer lugar, en esta especie existen cepas cuyos genes son reprimibles por glucosa (Breunig, 1989; Ferrero *et al.*, 1978). Por otro lado, de los datos de Budler (1964) y De Deken (1966a) se podría concluir que *K. lactis*, como *petite* negativa, es incapaz de fermentar; sin embargo, *K. lactis* es capaz de fermentar, si bien su producción de etanol es menor que la de algunas cepas de *S. cerevisiae* (Mazzoni *et al.*, 1992; Wésolowski-Louvel *et al.*, 1992a); por tanto no existe, en lo que se refiere a la disponibilidad de una fuente energética, un impedimento *a priori* para que pueda crecer en anaerobiosis.

Algunos datos recientes relacionan la capacidad de formación de mutantes *petites* con determinados genes nucleares responsables del mantenimiento de la integridad mitocondrial. Chen y Clark-Walker (1993) obtuvieron mutantes de *K. lactis* capaces de producir *petites* y que tenían afectados los genes nucleares *MGII* y *MGI2*. Sus resultados indican que el producto de estos genes es necesario para el mantenimiento de la integridad del genoma mitocondrial y les llevaron a postular que probablemente las levaduras *petite* positivas presenten de modo natural alteraciones en genes similares. Estos resultados se oponen a la interpretación que asociaba la incapacidad de formar *petites* con una dificultad de utilizar las vías fermentativas (Clark Walker y Miklos, 1974).

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
En aerobiosis predomina la fermentación	En aerobiosis predomina la respiración
Represión por glucosa de la tasa respiratoria	No hay represión por glucosa de la tasa respiratoria
Petite positiva	Petite negativa
Cepas con elevada producción de etanol	Cepas con menor producción de etanol
Crecimiento en anaerobiosis	Escaso crecimiento anaerobio
No crece en lactosa	Crece en lactosa

Tabla I. Características que diferencian a *Kluyveromyces lactis* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Todas las características descritas, denotan una clara diferencia entre el metabolismo respiro-fermentativo de las especies *S. cerevisiae* y *K. lactis*. De aquí se desprende el interés que tiene el conocer la regulación de los genes que codifican para las proteínas implicadas en la respiración de *K. lactis*, especialmente en lo que atañe al gen citocromo *c*, puesto que la regulación de su homólogo en *S. cerevisiae* es una de las mejor conocidas en levaduras.

Los genes *RAG* de *K. lactis*, implicaciones en el metabolismo respiro-fermentativo

Las características comentadas en el apartado anterior indican grandes diferencias entre *S. cerevisiae* y *K. lactis* en lo que respecta al metabolismo respiro-fermentativo. La mayoría de las cepas de *K. lactis* son capaces de crecer en medios con concentraciones de glucosa mayores del 1% cuando la respiración es bloqueada por inhibidores mitocondriales como la antimicina A o la oligomicina, este fenotipo se conoce como Rag⁺ (Resistencia a Antimicina en Glucosa); las cepas Rag⁻ son incapaces de crecer por vía fermentativa en presencia de tales antibióticos (Goffrini *et al.*, 1989).

RAG1 codifica para un transportador de glucosa de baja afinidad.

El gen *RAG1* codifica para un transportador de glucosa / fructosa de baja afinidad. Los análisis de mRNA y la cuantificación por determinación de la actividad β -galactosidasa de la fusión *RAG1-LacZ* revelaron que el gen *RAG1* se expresa pobremente en células que crecen en condiciones no fermentativas, siendo inducida su expresión más de 10 veces cuando crece en glucosa, fructosa y algunos otros azúcares. Adicionalmente, en *K. lactis* existe un sistema de alta afinidad para el transporte de glucosa cuyo gen se expresa constitutivamente. El gen *RAG1* complementa la mutación de *SNF3* (transportador de glucosa de alta afinidad de *S. cerevisiae*) cuando se encuentra presente en un vector multicopia; su disrupción resulta en una pérdida del transportador de baja afinidad y en la aparición del fenotipo RAG⁻ (Goffrini *et al.*, 1990). La expresión del gen *RAG1* se encuentra bajo el control de al menos tres genes de acción trans: *RAG4*, *RAG5* y *RAG8*. (Wésolowski *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1992).

El gen RAG2 codifica para una glucosa fosfato isomerasa.

El gen *RAG2* codifica para una glucosa fosfato isomerasa y su secuencia, presenta un 86% de homología con el gen *PGI* (glucosa fosfato isomerasa) de *S. cerevisiae* (Wésolowski *et al.*, 1988). Además, el gen *RAG2* complementa la mutación *pgi1* de *S. cerevisiae*; sin embargo, los mutantes *rag2-1* pierden actividad glucosa fosfato isomerasa, y no presentan el patrón isoenzimático típico para la glucosa fosfato isomerasa (Goffrini *et al.*, 1991). La expresión de *RAG2* es constitutiva, independientemente de los sustratos de crecimiento.

A diferencia de los mutantes *pgi* de *S. cerevisiae*, los mutantes *rag2* son capaces de crecer en glucosa por lo que se ha sugerido que las cepas que pierden la enzima glucosa fosfato isomerasa pueden metabolizar glucosa siguiendo la ruta de las pentosas fosfato (Goffrini *et al.*, 1991, Mazzoni *et al.*, 1992), esta ruta no es funcional en los mutantes *pgi* de *S. cerevisiae* (Gancedo y Serrano, 1989). Los mutantes *rag2* no producen etanol al crecer en glucosa y la pequeña cantidad de piruvato que generan es utilizada vía respiración (Goffrini *et al.*, 1991; Mazzoni *et al.*, 1992).

Las cepas de *K. lactis* portadoras de los alelos recesivos *rag1* o *rag2* dependen de un buen funcionamiento mitocondrial para su crecimiento en glucosa (Goffrini *et al.*, 1989). En la cepa MW98-8c (*rag1*, *rag2*), la glucosa se cataboliza menos eficientemente que en la línea salvaje. En los mutantes *rag1* la glicolisis no se encuentra totalmente bloqueada ya que todavía son capaces de producir etanol, pero la tasa de

formación de alcohol se ve muy reducida, pasa de 1,2% peso/volumen a un 0,45% peso/volumen, (Wésolowski *et al.*, 1992a). En la figura 2 se presenta un esquema del efecto que tienen las mutaciones *rag1* y *rag2* sobre el crecimiento en glucosa de *K. lactis*.

Existen diferencias en los mutantes pgi-rag2 y pfk-Klpfk.

También existen diferencias en la regulación de la vía glicolítica entre *S. cerevisiae* y *K. lactis* en lo que respecta a los genes *PFK1* y *PFK2* que codifican para la fosfofructoquinasa-1 y 2 respectivamente. La disrupción de estos genes en *S. cerevisiae* produce una pérdida de la capacidad de crecimiento en glucosa; sin embargo, los dobles mutantes de *K. lactis* (*Klpfk1*, *Klpfk2*) mantienen esta capacidad de crecimiento en glucosa. En *K. lactis*, los dobles mutantes así como los mutantes *Klpfk2* son incapaces de crecer en glucosa en presencia de inhibidores mitocondriales y este efecto se corresponde con el fenotipo *RAG*⁻ (Heinish *et al.*, 1993).

Los datos de crecimiento en glucosa de los mutantes *pgi* y *pfk* de *K. lactis* sugieren que la ruta de las pentosas fosfato y la respiración desempeñan un papel substancial en la utilización de glucosa en *K. lactis* (Goffrini *et al.*, 1991; Heinish *et al.*, 1993) a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae* (Gancedo y Serrano, 1989; Gamo *et al.*, 1993).

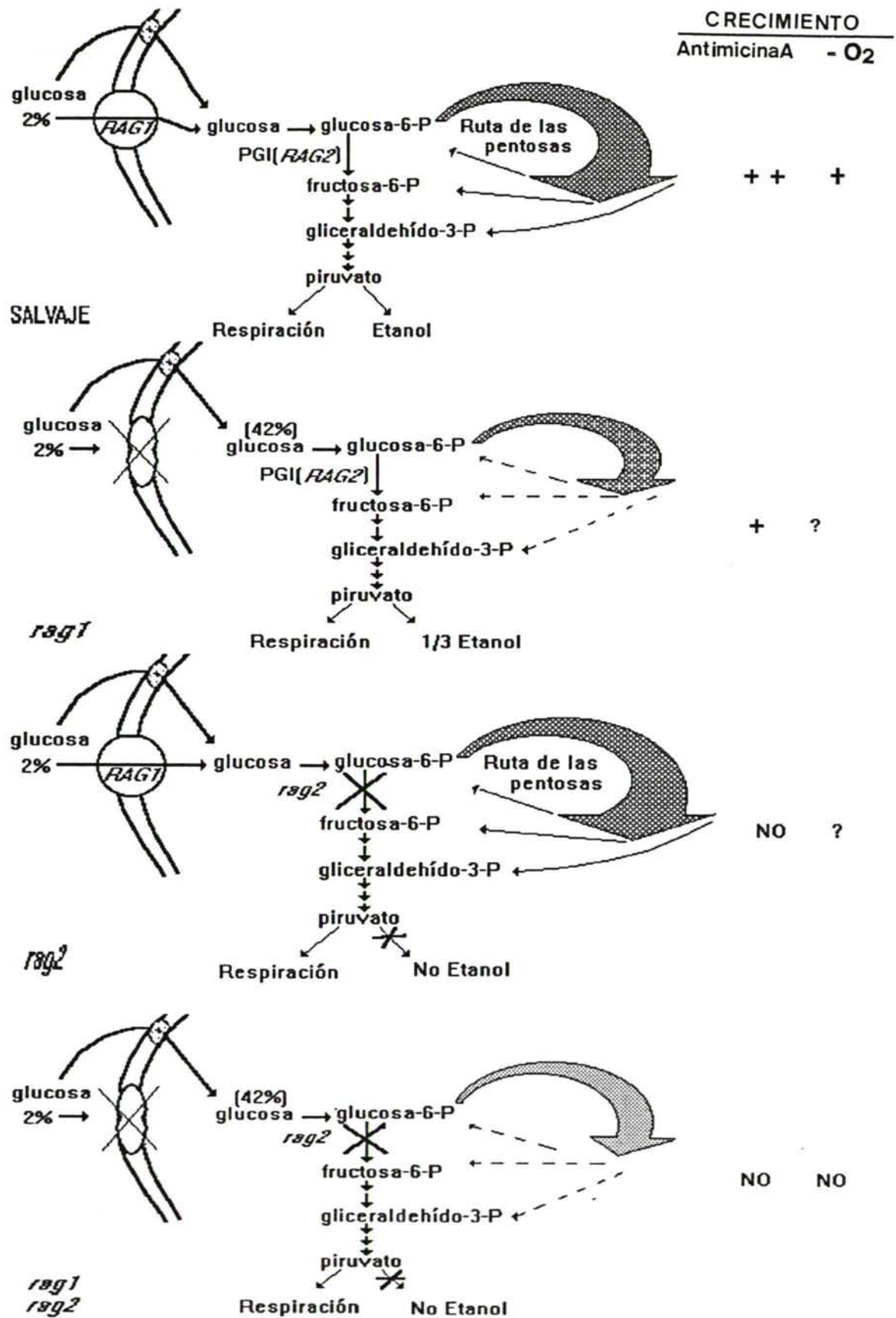


Figura 2. Utilización de la glucosa en cepas *RAG*⁺ y mutantes *RAG*⁻ de *K. lactis*.

INACTIVACIÓN POR GLUCOSA / REPRESIÓN CATABÓLICA

El término inactivación por catabolitos o su opuesto, activación por catabolitos, se refiere a la rápida disminución, o aumento, de la actividad de determinadas enzimas que tiene lugar cuando se adiciona glucosa a las células que están creciendo sobre fuentes de carbono no fermentables como el glicerol. Es el caso de la inactivación descrita para fructosa-1,6-bifosfatasa (Gancedo y Gancedo, 1971; Holzer, 1976); como ejemplo contrario está la activación de la trehalasa (van der Plaats, 1974; Ortiz *et al.*, 1983). En la mayoría de los casos, el decrecimiento en los niveles de actividad enzimática causados por la glucosa es paralelo al decrecimiento del mRNA correspondiente, este fenómeno es conocido como represión catabólica (Gancedo y Gancedo, 1986; Gancedo, 1992; Entian y Barnett, 1992). La represión por glucosa es un fenómeno ampliamente extendido en la regulación de los genes de microorganismos. El grado de represión por glucosa puede variar desde 4 veces para la isocitrato deshidrogenasa (NAD-dependiente) hasta 800 veces en el caso de la invertasa (Gancedo, 1992). La represión por glucosa del *CYC1* es de 4 veces (Zitomer y Hall, 1976). La disminución de los niveles de mRNA puede deberse bien a un efecto de la glucosa sobre la tasa de transcripción, a un efecto sobre la estabilidad del mensajero o bien a ambas causas.

El estudio de mutaciones que afectan a la represión por glucosa permitió conocer algunos de los mecanismos que la regulan (Gancedo, 1992; Entian y Barnett, 1992). La hexoquinasa PII parece actuar como sensor de los niveles de glucosa, si bien aún no se sabe cuál es la señal para que se produzca la represión. Las mutaciones que afectan a activadores transcripcionales como HAP4 evitan la desrepresión de la transcripción en ausencia de glucosa; en otros casos, el estudio de líneas mutantes en las que no se produce represión catabólica permitió identificar represores específicos de la transcripción en presencia de glucosa, como es el caso de MIG1 (Nehlin y Ronne, 1990).

Los factores reguladores TUP1 y SSN6 forman un complejo estable y ejercen un papel represor en presencia de glucosa; los mutantes *ssn6* y *tup1* suprimen el efecto de la mutación *snf1* que produce incapacidad de inducir la expresión de invertasa en ausencia de glucosa. Estas mutaciones aumentan la expresión de *CYC7*, *CYC1* y *COX6* (Zang *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1991; Entian y Barnett, 1992; Zitomer y Lowry, 1992); también afectan a otras funciones celulares como la capacidad de floculación o la producción de ascosporas.

INTERACCIÓN NÚCLEO-MITOCONDRIA

El hecho de que la mayoría de las proteínas que se encuentran en la mitocondria sean codificadas por genes nucleares implica la necesidad de una coordinación de la expresión de estos genes para adecuarla al estado de la mitocondria y a las condiciones de crecimiento de la célula (Forsburg y Guarente, 1989a). Para ello es necesaria la existencia de señales que, actuando como sensores de estas condiciones celulares, permitan la comunicación núcleo-mitocondria.

Como ya se ha comentado anteriormente, los mutantes *petite* de *S. cerevisiae* forman colonias de menor tamaño que las cepas salvajes al crecer en glucosa; esta característica se debe a la incapacidad de dichas cepas de metabolizar el etanol producido a partir de la glucosa (Tzagoloff y Dieckerman, 1990). Los mutantes *petite* citoplasmáticos presentan grandes deleciones del DNA mitocondrial (Faye *et al.*, 1973) y son incapaces de crecer en medios no fermentables. Los mutantes *pet*, o *petite* nucleares, también dependen para su crecimiento de la disponibilidad de fuentes de carbono fermentables. La mayoría de las causas que llevan al fenotipo *pet* resultan de mutaciones en genes nucleares relacionados con el metabolismo oxidativo de la mitocondria, pero también lo producen determinadas mutaciones en enzimas gluconeogénicas implicadas en la biosíntesis de compuestos que son necesarios para la biosíntesis de la pared celular (Tzagoloff y Dieckermann, 1990). Los genes relacionados con las mutaciones *pet* son un ejemplo de la dependencia de las funciones mitocondriales respecto de las funciones nucleares. De modo inverso, existen genes nucleares que ven afectada su expresión por el estado mitocondrial. Este es el caso del gen *CIT2* que codifica para una isocitrato sintasa peroxisomal, su expresión se ve incrementada a nivel transcripcional hasta 30 veces en cepas ρ^0 (sin DNA mitocondrial) respecto a los niveles que alcanza en una cepa cuyo DNA mitocondrial se encuentra intacto (Liao *et al.*, 1991; Liao y Butow, 1993).

Señales que median la relación núcleo-mitocondria:

Dos de las principales señales que median la relación núcleo-mitocondria son la disponibilidad de oxígeno y la fuente de carbono. El grupo hemo participa como grupo prostético de la estructura de muchas proteínas, entre ellas los citocromos y las catalasas, pero también desempeña un importante papel como regulador de la expresión génica. Su biosíntesis, que se lleva a cabo en la mitocondria, requiere oxígeno y parece claro su papel de sensor de los niveles de oxígeno en levaduras (Padmanaban *et al.*, 1989;

Poyton y Burke 1992). Sin embargo, el oxígeno puede actuar también directamente como señal reguladora independiente de hemo, un ejemplo de ello es la regulación del gen *PET 494* (cuya proteína presenta una cierta homología con el factor de iniciación de la traducción eIF2a), o la propia biosíntesis de hemo (revisiones de Forsburg y Guarente, 1989a; Zitomer y Lowry, 1992; Poyton y Burke, 1992).

Muchos genes nucleares relacionados con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, el ciclo del glioxalato, la cadena respiratoria (revisiones de Entian y Barnett, 1992; Gancedo, 1992 y Trumbly, 1992) y la biosíntesis de hemo están sometidos a represión catabólica (Forsburg y Guarente, 1989a).

Por tanto el oxígeno y la fuente de carbono son las señales fisiológicas encargadas de coordinar la regulación de la expresión de los genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales permitiendo o evitando una respiración eficiente. La regulación de la expresión de los genes citocromo *c* de la levadura *S. cerevisiae* responde a estas dos señales.

Genes regulados por hemo

En *S. cerevisiae* existen dos clases de genes regulados por hemo:

1- Genes ***hemo-activados***, cuya transcripción se incrementa en condiciones aerobias; la mayoría codifican para funciones respiratorias. La activación transcripcional mediada por hemo depende de dos posibles factores: la proteína hemo-dependiente HAP1 o el complejo hemo-dependiente y sensible a represión catabólica HAP2/3/4. Los genes *CYC1*, que codifica para el iso-1-citocromo *c*, *COR2*, subunidad 2 de la citocromo *c* oxido-reductasa, *CYT1*, citocromo *c1* y *CYB2*, citocromo *b2*, se ven activados por ambos complejos (Zitomer y Lowry, 1992).

2- Genes ***hipóxicos***, que se activan cuando la concentración de oxígeno es baja; muchos de ellos son reprimidos por hemo. A este grupo pertenecen los genes *COXVB*, gen que codifica para la subunidad V de la citocromo *c* oxidasa, *ANB1*, para el factor de inicio de la traducción eIF5a (Lowry y Leiber, 1986; Lowry *et al.*, 1990; Poyton y Burke, 1992) y *CYC7*, para el iso-2-citocromo *c* (Zitomer *et al.*, 1987; Zitomer y Lowry, 1992).

La represión mediada por hemo requiere el producto del gen *ROX1* (Lowry y Zitomer, 1988). *ROX1* reprime, en condiciones aerobias, la expresión del gen *CYC7* (Zitomer y Lowry, 1992). También el gen *AAC3* que codifica para un translocador ADP/ATP mitocondrial se ve reprimido por hemo a través del gen *ROX1* (Sabová *et al.*, 1993). El gen *REO1*, aislado inicialmente como represor de *COXVB* (Trueblood *et al.*, 1988), ha resultado ser igual a *ROX1* (Zitomer y Lowry, 1992). A pesar del extenso y general papel represor de *ROX1*, no se descarta la posible existencia de otros represores. El propio factor HAP1 puede actuar como represor sobre el gen *14DM (ERG11)* (Turi y Loper, 1992), gen estructural que codifica para la enzima lanosterol-14-desmetilasa implicada en la biosíntesis de hemo (Verdiere *et al.*, 1991).

La proteína citocromo *c*

El citocromo *c*, inicialmente estudiado por Keilin (1930), está constituido por una sola cadena polipeptídica de pequeño tamaño (103-110 aminoácidos, según las especies) unida covalentemente a un grupo hemo. Desde el punto de vista funcional es un componente de la cadena de transporte de electrones localizada en la membrana interna mitocondrial. El citocromo *c* reducido actúa como donador de electrones a la citocromo *c* oxidasa en el paso final de las reacciones redox implicadas en la respiración. La citocromo *c* oxidasa transfiere los electrones hasta el oxígeno en una reacción irreversible cuyo producto final es H₂O.

Transporte del apocitocromo *c* a la mitocondria

La mitocondria posee su propio sistema genético y su propia maquinaria de síntesis, sin embargo, la información genética contenida en el genoma mitocondrial representa tan sólo el 5% de todas las proteínas presentes en ella. En consecuencia, la mayoría de las proteínas mitocondriales, incluido el citocromo *c*, son codificadas por genes nucleares (Tzagoloff y Dieckmann, 1990), sintetizadas en el citoplasma y transportadas a la mitocondria, pudiendo experimentar diferentes procesamiento en el transcurso de su recorrido hasta el compartimento mitocondrial (Guérin, 1991; Neupert *et al.*, 1990).

El transporte de apocitocromo *c* a la mitocondria ha sido estudiado en *Neurospora crassa* y en *S. cerevisiae*. En *S. cerevisiae* la metionina del extremo amino terminal se escinde antes de finalizar la traducción (Sherman *et al.*, 1985). Para unirse a la membrana externa mitocondrial el apocitocromo *c* no necesita de ningún receptor

específico ni requiere potencial de membrana (Nye y Scarpulla, 1990; Dumont *et al.*, 1991), pero en ambas especies parece necesaria la metilación de la Lys77 para que se produzca dicha unión (Cessay *et al.*, 1991).

La formación del holocitocromo *c* (apocitocromo *c* + hemo) requiere hemo en estado reducido. La unión de hemo reducido al citocromo *c* está catalizada por la citocromo *c* hemo liasa (Nicholson y Neupert, 1989). En *N. crassa*, la unión al grupo hemo es además un requisito imprescindible para la translocación del citocromo *c* al espacio intermembranal; la unión con hemo produce un cambio conformacional que hace que la proteína atraviese la membrana externa y quede localizada en el espacio intermembranal. En *S. cerevisiae* el apocitocromo *c* puede ser transportado, de un modo reversible, en ausencia de unión a hemo. La unión del grupo hemo se produce en el espacio intermembranal, previa unión del apocitocromo *c* a la citocromo *c* hemo liasa. La unión covalente del grupo hemo mediada por esta enzima impide la salida del citocromo *c* del interior de la mitocondria, haciendo irreversible su transporte (Dumont *et al.*, 1991).

El transporte de citocromo *c* es uno de los ejemplos más sencillos de transporte al interior de la mitocondria. El citocromo *cI* es muy similar al *c* en cuanto a que ambas proteínas tienen la misma localización funcional y, en *N. crassa*, tienen el mismo grupo prostético, protohemo IX. Sin embargo, el citocromo *cI* sigue una ruta mucho más elaborada y compleja para acceder al espacio intermembranal; necesita receptores específicos y un procesamiento del péptido inicial mediante proteólisis previas a la unión de hemo (Stuart *et al.*, 1990). En otros muchos casos existen requerimientos energéticos, como la existencia de un potencial eléctrico de membrana, para que se produzca la translocación de los precursores (Neupert *et al.*, 1990).

REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE CITOCROMOS EN LEVADURAS

El inicio de la síntesis de RNA mensajero es el punto primario de control en la regulación diferencial de la expresión génica (Mitchell y Tjian 1989) y depende en último término de factores que actúan sobre elementos específicos de los promotores, en respuesta a cambios fisiológicos. Los genes *CYC1* y *CYC7* de *S. cerevisiae* que codifican para iso-1-citocromo *c* (Smith *et al.*, 1979) e iso-2-citocromo *c* (Montgomery *et al.*, 1980), se ven regulados a nivel transcripcional en respuesta a los niveles de oxígeno (señal mediada por hemo) y la presencia de fuentes de carbono no fermentables (Guarente y Mason, 1983; Guarente *et al.*, 1984; Forsburg y Guarente, 1989a; Zitomer y Lowry, 1992).

Los elementos requeridos para llevar a cabo la regulación transcripcional son la existencia de secuencias específicas, elementos *cis* localizados generalmente en la región 5' del gen, y la interacción con proteínas nucleares que regulan la transcripción. Los genes de levaduras que son transcritos por la RNA polimerasa II a menudo se encuentran bajo el control de complejos sistemas reguladores. Existen dos tipos de elementos *cis*, aquellos que determinan el sitio de inicio de la transcripción y aquellos que determinan la tasa de transcripción génica. Al primer grupo de elementos *cis* pertenecen los elementos TATA. En eucariotas superiores es frecuente encontrar un único punto de inicio de la transcripción controlado por una secuencia TATA, normalmente localizada a una distancia de 25 a 30 pb del punto de inicio. Sin embargo, en levaduras es frecuente encontrar varias secuencias TATA y varios puntos de inicio de la transcripción. El factor TFIID se une al elemento TATA, en el primer paso del ensamblaje de un complejo de transcripción activo, compuesto por múltiples factores (TFIIA, IIB, IID, IIE, IIF), necesarios para el inicio de la transcripción por la RNA polimerasa II. TFIID de *S. cerevisiae* es homólogo al factor transcripcional de eucariotas superiores y es funcionalmente intercambiable con el factor TFIID humano (Sawadogo y Sentenac, 1990; Cormack *et al.*, 1991).

El gen *CYC1* contiene cuatro puntos principales de inicio de la transcripción situados a -9, -38, -46 y -61 pb respecto al codón de inicio. A diferencia de lo que ocurre en eucariotas superiores, la distancia entre el elemento TATA y el punto de inicio no cambia el punto de inicio de la transcripción (McNeil y Smith 1986). Las secuencias consenso para el punto de inicio en levaduras son TC(G/A)A y RRYRR (donde R es una purina e Y una pirimidina). En la región promotora del *CYC1* no se ha encontrado ninguna señal específica para el inicio de la transcripción coincidente con dichas secuencias consenso (McNeil y Smith, 1986). En un trabajo posterior Furthergraves y Hall (1990) definieron la secuencia Py-A-A/T-(Pu) como consenso para el inicio de la transcripción, pero el mecanismo de selección del sitio de inicio seguía por determinar. Pinto y colaboradores (1992), clonaron el gen *SUA7* de *S. cerevisiae* que codifica para un gen homólogo al factor TFIID humano; *SUA7* es necesario para una selección normal del punto de inicio de la transcripción de los genes *CYC1* y *ADHI*. El gen de *K. lactis* *KISUA7* homólogo a *SUA7* de *S. cerevisiae*, mantiene su papel sobre la selección del punto de inicio del gen *ADHI* pero no sobre *CYC1* de *S. cerevisiae* (Na y Hampsey, 1993).

McNeil (1988) comprobó que en la región promotora del *CYC1*, situada entre un TATA funcional y el punto de inicio, existe una secuencia de 37 pb de las cuales 32 son pirimidinas; por esta razón denominó a esta región "elemento rico en pirimidinas", su función es eliminar mensajeros que comiencen en posición 5' respecto a esta secuencia.

Su longitud es importante puesto que un acortamiento en 10 pb elimina su actividad; este elemento se ha encontrado también en otros promotores de levaduras, entre ellos el del gen *GALI*.

El segundo tipo de elementos *cis* comprende aquellas secuencias necesarias para la activación y la represión de la transcripción, mediante la interacción con factores reguladores *trans* generando niveles de transcripción distintos de los basales. Estas regiones pueden estar localizadas a distancias entre 100 y 1.500 pb en dirección 5' respecto al sitio de inicio; pueden actuar como secuencias reguladoras positivas, recibiendo el nombre de UAS, o negativas, URS, reduciendo o silenciando la transcripción. Las UAS se diferencian de los *enhancers* o intensificadores eucariotas en que no son capaces de actuar cuando se sitúan en posición 3' de la región codificadora (Guarente *et al.*, 1984; Struhl *et al.*, 1989).

Las proteínas que se unen a los elementos *cis*, por lo general poseen dominios diferenciados, unos para la unión al DNA y otros para la activación transcripcional, pudiendo presentar varios de este tipo. Los dominios de activación interaccionan con los componentes básicos de la maquinaria transcripcional (Mitchell y Tjian 1989; Struhl 1989). Para los dominios de unión al DNA se han descrito varias estructuras: *dedos de zinc*, *hélice-giro-hélice* y *cremallera de leucinas*; este último es un dominio de dimerización de proteínas que se unen al DNA. Ejemplos de dominios de activación son el dominio ácido, ampliamente conservado entre eucariotas, así como las regiones ricas en glutamina, o los dominios ricos en prolina (Mitchell y Tjian 1989; Johnson y McKnight, 1989).

Las interacciones entre elementos *cis* y factores *trans* pueden ser muy variadas, pudiendo combinarse en el caso más sencillo un solo elemento *cis* con un único factor *trans*; pero además un sitio *cis* puede interaccionar individualmente con varios factores *trans* o con un complejo formado por varios de ellos, existiendo la posibilidad de que un factor *trans* actúe alternativamente como activador o represor. Estas interacciones pueden estar mediadas por un modulador sensible a los cambios que se producen en el medio; el modulador puede actuar sobre el factor activador bien uniéndose a él, o bien induciendo la formación de un complejo activo mediante cambios conformacionales, interacciones proteína-proteína o por modificación covalente (Struhl, 1989).

En la región promotora del gen *CYC1* existen dos regiones UAS. El UAS1 (posiciones -298 a -241) está activado por HAP1 y el UAS2 (posiciones -230 a -178) por

el complejo HAP2/3/4 (Guarente *et al.*, 1984; Pfeiffer *et al.*, 1987a,b; Forsburg y Guarente, 1989a,b).

Activación transcripcional mediada por HAP1

1-Regulación de CYC1 mediada por HAP1

El activador transcripcional HAP1 fué el primero identificado como modulador de la expresión de *CYC1* (Guarente *et al.*, 1984). La activación del gen *CYC1* en condiciones aerobias se produce mediante la unión de *HAP1* a los subsitios A y B del UAS1. Esta unión se ve estimulada *in vitro* por hemo (Sousa y Arcangioli, 1989). El factor RC2 compite con HAP1 por la unión al UAS1B, esta unión es independiente de hemo y su función no está clara. Se piensa que la unión de HAP1 y RC2 es mutuamente exclusiva (Pfeiffer *et al.*, 1987b).

Por experimentos de retardación en gel, se sabe que hemo estimula la formación de dos complejos dependientes de HAP1, el de mayor tamaño sólo es visible al adicionar hemo. Los contactos de HAP1-DNA deducidos por experimentos de *footprinting* son iguales para ambos complejos (Pfeiffer *et al.*, 1987b).

El gen *HAP1*, ha sido clonado y secuenciado independientemente por dos grupos (Cruesot *et al.*, 1988; Pfeiffer *et al.*, 1989). La estructura de la proteína HAP1, deducida a partir de la secuencia nucleotídica del gen contiene 1.483 residuos aminoacídicos y tres dominios funcionales:

- Un motivo *dedo de Zinc* próximo al extremo amino (residuos 1-148) y necesario para la unión al DNA.

- Una región ácida, común a muchos dominios de activación transcripcional localizada en el extremo carboxilo (residuos 1.308-1.483).

- Una región comprendida entre los residuos 280 y 438 que contiene 7 repeticiones de la secuencia aminoacídica KCPVDH. La eliminación de esta región hace que la activación a través de HAP1 resulte constitutiva e independiente de hemo. Dado que hemo promueve la activación de HAP1 *in vivo* (Guarente y Mason, 1983) y estimula la unión de HAP1 al DNA *in vitro* (Pfeiffer *et al.*, 1987a), en principio se pensó que esta

región enmascaraba el dominio de unión al DNA en ausencia de hemo (Creusot *et al.*, 1988; Pfeiffer *et al.*, 1987a).

Fytlovich y colaboradores (1993) comprobaron que al sobre-expresar (CYP1) HAP1 en la fusión GAL4-CYP1 se produce la formación de un complejo CYP1-DNA sin la adición de hemina. Este complejo es de mayor tamaño que el que aparece cuando CYP1 se expresa a niveles normales. Estos autores lo explican por la interacción entre CYP1 y un complejo X. Curiosamente al adicionar hemina aparece una banda de menor tamaño. El complejo CYP1-X se une al DNA *in vitro*. La eliminación de la repetición KCPVDH lleva a la pérdida de la interacción CYP1-X, por lo que se piensa que esta región es necesaria para la interacción de los dos factores. *In vivo*, la delección del motivo KCPVDH afecta a la transcripción de *CYB2*, *CYC1*, *CYC7* y *ERG2* que aumentan sus niveles de transcripción cuando se expresan en mutantes *hem1* (defectivo en la biosíntesis de hemo). Propusieron un modelo según el cual la proteína CYP1 (HAP1) forma un complejo con el factor X unido a la región KCPVDH. La adición de hemo produciría la disociación de X y llevaría a la activación de la transcripción probablemente por la fijación de hemo a la secuencia KCPVDH o a alguna región adyacente.

2-Regulación de otros genes mediada por HAP1.

La proteína HAP1 tiene la misma afinidad para la unión al UAS1 de *CYC1* que al UAS de *CYC7*, pese a que la secuencia del UAS de *CYC7* está degenerada respecto a la primera; sin embargo, el efecto activador es muy distinto y como resultado *CYC7* tiene un nivel muy bajo de expresión. Las mutaciones *CYP1-16* y *CYP1-18* provocan un incremento en la expresión del gen *CYC7* en condiciones aerobias; estas mutaciones contienen un cambio de la Ser 63 por Arg, el aminoácido en esta posición se incluye en el *dedo de Zn* de CYP1 (Verdiere *et al.*, 1988). Curiosamente el *CYC1* ve disminuida su expresión en estos mutantes (Zitomer *et al.*, 1987, Cerdán y Zitomer, 1988). Parece por tanto que la activación transcripcional a través de HAP1 se ajusta al modelo según el cual, interacciones alostéricas entre el dominio de unión al DNA y el dominio de activación son sensibles al tipo de UAS (Forsburg y Guarente, 1989a).

Turcotte y Guarente (1992), tras estudiar el efecto de mutaciones puntuales sobre el UAS1 de *CYC1* y UAS del *CYC7* proponen la existencia de un cofactor cuyo papel sería estabilizar la ocupación del UAS por HAP1 *in vivo*. Probablemente este cofactor sea diferente en el caso del UAS1 del gen *CYC1* y del UAS del gen *CYC7*. La diferencia en la secuencia de los dos sitios especificaría la unión de un cofactor u otro.

HAP1 puede también activar la transcripción de *HEM13*, bien en ausencia de hemo, o en condiciones anaerobias; no se sabe si actúa directamente sobre el promotor o si su acción es indirecta. En condiciones hipóxicas HAP1 reprime la transcripción de *14DM* (Verdiere *et al.*, 1991). HAP1 resulta ser por tanto un interesante regulador que puede actuar como represor o como activador dependiendo de los niveles de oxígeno/hemo en la célula; se ha propuesto que la naturaleza de su función reguladora depende de las características de la UAS sobre la que actúa, puesto que la regulación de los genes *HEM13* y *14DM* en ausencia de hemo, idéntica señal fisiológica, es opuesta.

Activación a través del complejo HAP2/3/4:

Cuando las células de *S. cerevisiae* pasan de crecer en un medio con glucosa a un medio no fermentable se produce una activación transcripcional del *CYC1* a través del UAS2; esta inducción es de 50 veces al pasar de glucosa a lactato. La adición de hemo a células que están creciendo en glucosa también produce la activación de la transcripción a través del UAS2 (Guarente *et al.*, 1984). Esta región contiene a su vez dos subsitios: La región 1, a la que se une el complejo multimérico HAP2/3/4 que contiene una caja CCAAT similar a la que se encuentra en los promotores de eucariotas superiores, y la región 2 a la que se une un factor independiente de HAP2/3/4 denominado factor A; esta región aumenta 5 veces la actividad de la región 1 (Forsburg y Guarente, 1989b).

Los genes *HAP2*, *HAP3* y *HAP4* fueron clonados por complementación de sus respectivos mutantes previamente seleccionados por alterar la expresión del gen *LacZ* fusionado a UAS2. Los mutantes *hap2* y *hap3* producen una reducción en los niveles de citocromos y la incapacidad para el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables. (Pinkham y Guarente, 1985; Hahn *et al.*, 1988 y Forsburg y Guarente, 1989b).

HAP2 codifica para una proteína de 265 aminoácidos; la región comprendida entre las posiciones 154-197 parece imprescindible para la unión a HAP3 y HAP4, además existe un tramo poliglutamina entre las posiciones 120 y 133 y la región carboxi-terminal es altamente básica (Pinkham *et al.*, 1987). HAP3 es una proteína de 144 residuos, su mensajero se solapa casi por completo con un RNA anti-sentido de función desconocida y cuya eliminación no afecta a la función de HAP3 (Hahn *et al.*, 1988). La unión de HAP2 y HAP3 es interdependiente, ambas proteínas pueden interaccionar en ausencia de DNA (Olesen *et al.*, 1987).

Los factores HAP2 y HAP3 presentan homología funcional con CP1, un factor transcripcional de mamíferos que se une a la caja CCAAT, está formado por dos fracciones CP1A y CP1B que pueden separarse por técnicas cromatográficas; HAP2 es homólogo a CP1B y HAP3 a CP1A y son funcionalmente intercambiables (Chodosh *et al.*, 1988). HAP2 ha sido clonado también en *Schizosaccharomyces pombe*, la homología de *Php2* con HAP2 de *S. cerevisiae* se restringe casi exclusivamente a un "núcleo esencial" de 60 aminoácidos con el que conserva una homología del 82%. La proteína codificada por el gen *Php2* también se une a CCAAT, y se encuentra específicamente relacionada con las funciones mitocondriales (Olesen *et al.*, 1991).

La clonación y secuenciación de HAP4 (Forsburg y Guarente, 1989b) permitió estudiar tanto su estructura como su regulación transcripcional. El gen HAP4 codifica para una proteína de 553 aminoácidos con una corta región básica entre los residuos 54 y 80. Existe una región altamente ácida en su extremo carboxilo cuya eliminación inactiva la función de la proteína *in vivo*. Al ser reemplazada por el dominio de activación de GAL4 se restablece su función. Esta información sobre la estructura de la proteína sugiere que el extremo carboxi-terminal es el principal dominio de activación mientras que la región amino terminal se requiere para el ensamblaje al complejo de unión al DNA. El gen HAP4 ve activada su transcripción en lactato y parece intervenir en el control transcripcional por fuente de carbono.

Los factores TUP1 y SSN6 desempeñan un papel en la represión catabólica formando parte de la ruta que implica a la protein-quinasa SNF1. Pero esta ruta también afecta a la expresión de los genes *CYC1* y *COX6*, que disminuye en los mutantes *snf1* y aumenta en los mutantes *ssn6*. Parece probable que actúen a través del complejo HAP2/3/4, que es el responsable de la inducción en lactato de los citados genes (Zitomer y Lowry, 1992). En la figura 3a se muestra el mecanismo general de regulación del gen *CYC1*.

El gen *CYC7* de *S. cerevisiae* fué clonado por Montgomery y colaboradores (1980). Los primeros estudios de su región promotora indicaron que existen dos sitios reguladores, uno positivo, a -240, y otro negativo, situado a -300 pb, en dirección 5' a partir del codón de inicio de la traducción (Wright y Zitomer, 1984). Su transcripción se ve activada por HAP1 (Zitomer *et al.*, 1987; Cerdán y Zitomer, 1988) y reprimida por ROX1 en condiciones aerobias (Lowry y Zitomer, 1988). El factor TUP1 es necesario para la activación de *ROX1* y por tanto para la represión del gen *CYC7*. *SSN6* también es necesario para la represión mediada por *ROX1*, si bien no es necesario para la unión de *ROX1* al DNA (Zitomer y Lowry 1992). El gen *CYC7* ve también incrementada

su expresión, a nivel transcripcional, al alcanzar la fase estacionaria del cultivo, tras un choque térmico (38°C) y por bajos niveles de AMPc mientras que estas condiciones no afectan a la expresión del gen *CYC1* que no responde a estos estímulos (Pillar y Bradshaw, 1991). En la figura 3b se puede ver representado el mecanismo de control transcripcional de *CYC7*.

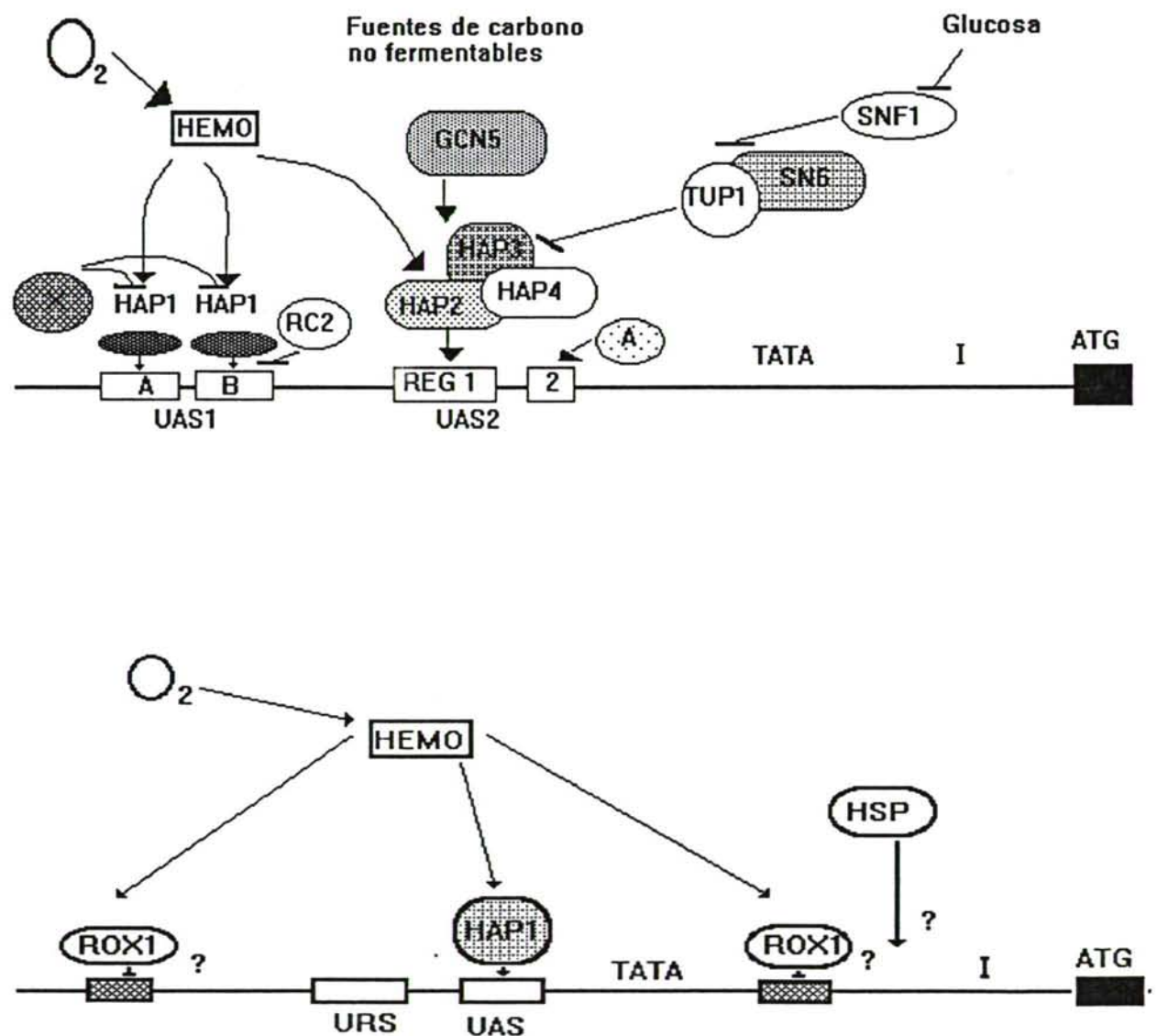


Figura 3. Regulación transcripcional de los genes que codifican para citocromo c de *S. cerevisiae*. A modelo para *CYC1*; B modelo para *CYC7*. HSP: proteína *heat shock*.

Secuencias necesarias para la terminación de la transcripción:

En la región 3' de la región codificadora de un gen se sitúan las secuencias necesarias para la terminación del mRNA y su posterior poliadenilación. En levaduras se ha sugerido la implicación de varias secuencias en la formación del extremo 3'. Estudiando el mRNA del gen *CYC1*, Zaret y Sherman (1982) propusieron la secuencia TAG...TAGT..(región rica en AT)...TTT como la necesaria para la correcta terminación de la transcripción. Osborne y Guarente (1989) propusieron una región rica en AT como señal suficiente para la terminación.

Russo y colaboradores (1991) formularon un modelo según el cual se necesitan dos elementos diferentes funcionando de modo concertado para la formación de extremos 3' en el mRNA de levaduras. Uno de los elementos, que podría ser la región rica en AT, determina el sitio preferido de terminación 3', mientras que el segundo, que incluye TAG..TATGTA, TATATA y TACATA actúa a distancia para intensificar la acción del primero. Es importante que las dos señales se encuentren a una distancia de al menos 5 nucleótidos (Russo *et al.*, 1991). Uno de los mutantes analizados presentaba la secuencia TTTTATATA, similar a la secuencia TTTTATA descrita por Heinikoff y Cohen (1984) como señal de terminación.

Se ha sugerido que terminación y poliadenilación se encuentran acopladas en levaduras. En eucariotas superiores la secuencia AAUAAAA es la responsable del reconocimiento de la rotura endonucleotídica y posterior poliadenilación de los mensajeros, esta secuencia no existe en más del 50% de los genes de levaduras y tampoco en el *CYC1*.

Regulación de la expresión de los genes citocromo *c* en otras especies de levaduras:

Como vimos anteriormente los genes *CYC1* y *CYC7* codifican para las proteínas iso-1 e iso-2-citocromo *c* en la levadura *S. cerevisiae* (Smith *et al.*, 1979; Montgomery *et al.*, 1980). Su regulación se ejerce principalmente a nivel transcripcional en respuesta a los niveles de oxígeno y la fuente de carbono. (Lowry *et al.*, 1983; Lowry y Zitomer, 1984; Wright y Zitomer, 1984; Guarente *et al.*, 1984; Arcangioli y Lescure, 1985; Forsburg y Guarente, 1989a). Es de esperar que la regulación de la expresión génica mediada por estas dos señales varíe en las distintas especies de levaduras en función de su

capacidad de crecimiento en condiciones de aerobiosis-anaerobiosis o adaptación a un ambiente con baja concentración de azúcares.

En levaduras, además de los dos genes de *S. cerevisiae* se han clonado y secuenciado los genes citocromo *c* de *Schizosaccharomyces pombe* (Russell y Hall, 1982), *Candida glabrata* (Clark-Walker, 1991) y *Schwanniomyces occidentalis* (Amegadzie *et al.*, 1990).

La regulación del *CYCo*, que codifica para el citocromo *c* de *Schwanniomyces occidentalis*, fué estudiada por Amegadzie y Zitomer (1990). Este gen está sometido a regulación por oxígeno pero el nivel de su mensajero no se ve afectado en relación con el crecimiento en diferentes fuentes de carbono. Sin embargo, en los experimentos de expresión heteróloga en células de *S. cerevisiae* transformadas con *CYCo* se observó represión por glucosa. Este resultado indica que los elementos reguladores *cis* y *trans* se encuentran conservados entre estas dos levaduras.

Hasta el momento no se conoce la regulación de los genes citocromo *c* de *C. glabrata* y *S. pombe*. La regulación del gen citocromo *c* de *Kluyveromyces lactis* es objeto del presente trabajo.

REGULACIÓN NO TRANSCRIPCIONAL DE CITOCROMOS

En la mayoría de los estudios sobre expresión génica en *S. cerevisiae*, se ha enfatizado la regulación a nivel transcripcional mediante interacción con complejos de transcripción. El nivel de citocromo *c* en la célula está regulado por numerosos procesos que comienzan en la transcripción del gen y continúan en la traducción, degradación de la forma "apo", importe a la mitocondria y unión a hemo.

Estabilidad de la proteína

Las dos isoformas de la apo-proteína citocromo *c* de *S. cerevisiae*, apo-iso-1 y apo-iso-2 citocromo *c*, pese a conservar una homología del 80%, presentan diferentes estabildades. Dumont y colaboradores estudiaron la estabilidad de la forma "apo" de la proteína mediante marcajes con anticuerpos. Midieron la estabilidad de los iso-1 e iso-2 inmunoprecipitados en el momento del marcaje y con el transcurso del tiempo. Sólo al

cabo de dos horas comenzaba a disminuir el nivel de apo-iso-2-citocromo *c*, mientras que el nivel de apo-iso-1 disminuía en pocos minutos (Dumont *et al.*, 1990).

En mutantes para el citocromo *c*, un cambio de 4 aminoácidos en la proteína produce una mayor estabilidad de la misma, esto llevó a pensar a Dumont y colaboradores en la posibilidad de una degradación debida a una proteasa específica que reconociese una secuencia determinada. De hecho estos autores encontraron una proteólisis ubiquitin-dependiente del iso-1-citocromo *c* (Dumont *et al.*, 1990). La proteasa específica aún no se ha encontrado, sin embargo, se ha caracterizado el gen *CYC12* que regula la degradación del citocromo *c* (Pearce y Sherman, 1992). Se piensa que la estabilidad diferencial de los dos citocromos puede ser parte de un proceso regulador que aumente la proporción de iso-2-citocromo *c* bajo ciertas condiciones fisiológicas, cambios anaerobiosis / aerobiosis, o represión / desrepresión (Dumont *et al.*, 1990).

Estabilidad de los mensajeros:

A finales de los años 70, se comprobó que algunas mutaciones sin sentido producidas en la región codificadora de los genes *URA3* o *CYC1*, originaban menores niveles de su mRNA en estado estacionario. En el caso de *URA3*, se demostró que este decrecimiento era debido a una disminución de la vida media del mRNA (Losson y Lacroute, 1979; Zitomer *et al.*, 1979).

La estabilidad de una molécula de mRNA, puede depender también de la fuente de carbono en la que se produce el crecimiento celular. Lombardo y colaboradores, al estudiar el gen *Ip*, que codifica para la subunidad *Ip* (iron-protein) de la succinato deshidrogenasa, encontraron discrepancias entre los resultados obtenidos en experimentos de Northern blot y la medida de actividad β -galactosidasa con el promotor del gen fusionado a *LacZ*, razón por la cual decidieron estudiar la estabilidad del mRNA en el estado estacionario. Encontraron que la vida media del mRNA de *Ip*, en medios con glucosa, es menor de 5 minutos, mientras que en glicerol el mRNA permanece durante una hora en ausencia de síntesis posterior. Los genes *CYC1* y *Fp* (subunidad flavoprotéica de la succinato deshidrogenasa) sufren el mismo proceso aunque en menor grado (Lombardo *et al.*, 1992). En consecuencia estos autores consideran que el uso de la fusión *LacZ* para estudiar promotores de levaduras ignora la posibilidad de un control post-transcripcional de los mecanismos de regulación.

En cuanto a genes que codifican para citocromo *c*, existen mutaciones en la secuencia de *CYC1* que aumentan la estabilidad del mensajero cuando la célula está en anaerobiosis, condiciones en las que no hay síntesis de mRNA (Pearce y Sherman, 1992).

Papel de la secuencia y estructura del mRNA en la traducción:

En levaduras, al igual que en eucariotas superiores, el codón AUG es necesario para un correcto inicio de la traducción, cambios en el codón de inicio del *CYC1* producen una drástica disminución de la proteína citocromo *c* (Sherman, 1990).

En eucariotas superiores se ha descrito la secuencia CCACCAAUGGC como el contexto adyacente óptimo para el codón de inicio de la traducción. En levaduras Laz y colaboradores (1987) propusieron la secuencia AAAAAAAUGUCU. Estudios posteriores indicaron que el contexto 5' del codón de inicio afecta muy poco a la traducción (disminuye dos veces en comparación con las 25 veces que disminuye en eucariotas superiores), lo mismo sucede al cambiar los nucleótidos situados 3' del AUG en el *CYC1* (Clements *et al.*, 1989).

Pese a que en las inmediaciones del codón AUG de *CYC1* no se requieren secuencias específicas para el inicio de la traducción, existen ciertas secuencias que pueden disminuir la traducción, aparentemente por la producción de estructuras secundarias en el mRNA. Se han estudiado diversas mutaciones en el mRNA de *CYC1* que producen "horquillas" que disminuyen la traducción por inhibición de la elongación. También se han descrito casos de "horquillas" en la región 3' del mRNA que producen alteraciones en la eficiencia de la traducción (Baim *et al.*, 1984; Clements *et al.*, 1989).

La traducción del iso-1-citocromo *c* se inicia en el primer AUG. En levaduras no es corriente que existan varios sitios de inicio de la traducción, pero existen excepciones. Los genes *GCN4* (activador transcripcional de los genes requeridos para la biosíntesis de aminoácidos) y *CPA1* (carbamil-fosfato sintetasa) son ejemplos de regulación traduccional. *GCN4* ve aumentada su traducción en condiciones de falta de aminoácidos mientras que la tasa de síntesis protéica general disminuye. *GCN4* posee cuatro pequeñas ORF en su región 5' (Thireos *et al.*, 1984). El incremento traduccional se debe a un proceso de reinicio de la traducción. La regulación de este paso se debe a la formación de complejos de pre-inicio entre la subunidad ribosómica 40S y el iniciador met-tRNA (complejos 43S), sólo cuando hay carencia de aminoácidos la subunidad 40S se salta

las ORF previas y consigue llegar al sitio de inicio de *GCN4* (Hinnenbush, 1990; Abastado *et al.*, 1991).

El mecanismo de regulación de *CPAI* no es muy conocido, pero se sabe que existe en la secuencia líder de *CPAI* un péptido de 25 aminoácidos. No se conoce el mecanismo según el cual este péptido líder reprime la traducción de *CPAI* (Werner *et al.*, 1990).

Relación uso de codones-niveles de expresión génica

La existencia de un código genético degenerado, hace que un mismo aminoácido pueda ser codificado por varios tripletes. Sin embargo, la elección entre codones sinónimos varía enormemente entre los diferentes grupos taxonómicos, (Grantham *et al.*, 1980). Para cada organismo, la elección de codones está relacionada con el nivel de producción de proteína de cada gen. (Grantham *et al.*, 1981; Ikemura 1982, 1985; Gouy y Gautier, 1982; Bennetzen y Hall, 1982b).

En *Saccharomyces cerevisiae* los genes de alta expresión utilizan casi exclusivamente 25 de los 61 codones con sentido existentes. Como contraste, los genes de baja expresión utilizan los 61 codones, sin mostrar una especial preferencia por ninguno de ellos. Los codones óptimos en *Escherichia coli* son traducidos por las especies mayoritarias de tRNA en la célula (Ikemura, 1982; Ikemura, 1985) y se piensa que en levaduras sucede lo mismo (Sharp *et al.*, 1988).

Se han llevado a cabo numerosos estudios para determinar las causas que llevan a los organismos a tener genes con su propio dialecto (genes con y sin preferencias por el uso de determinados codones, parece que se trata de un equilibrio entre la tasa de mutación y las fuerzas selectivas que actúan sobre el proceso de traducción de proteínas. (Sharp *et al.*, 1988; Anderson y Kurtland, 1990). Según Sharp y Cowe (1991) cualquier presión selectiva asociada con preferencias traduccionales entre codones sinónimos se impone a su tendencia mutacional. El grado de actuación de la selección sobre el uso de codones de un determinado gen depende del nivel de expresión génica.

Ticher y Graur (1989) en un trabajo en el que comparan 42 pares de genes homólogos que codifican para proteínas humanas y de rata, proponen que la variación en la tasa de sustituciones sinónimas puede ser explicada por la composición de nucleótidos en la tercera base del codón. Explican las diferencias en el uso de codones como consecuencia de una selección en contra de A o T en la tercera posición, produciéndose en cambio una

acumulación preferencial de C. Selección y mutación actúan en direcciones opuestas, la mutación propiciando A o T en la tercera posición y la selección eliminándolas. Para estos autores, la reducción en el número de errores en la traducción puede ser la fuerza selectiva que afecta a la tasa de sustituciones sinónimas y al patrón de uso de codones.

Anderson y Kurtland (1990) llevaron a cabo una extensa revisión de la relación del uso de codones con diversos parámetros funcionales como la traducción, los niveles de expresión de proteínas y las tasas de crecimiento celular en microorganismos. La tendencia al uso de un reducido número de codones, en los genes de alta expresión, de los microorganismos la relacionan con una optimización de la estrategia de crecimiento. Para que esta explicación sea válida es necesaria una coevolución de los patrones de utilización de codones y las abundancias de los correspondientes tRNAs.

Se han descrito implicaciones del uso de codones en la estabilidad del mRNA. Herrick y colaboradores (1990), analizando 15 genes de *S. cerevisiae*, encontraron una correlación negativa entre la vida media del RNA y el porcentaje de codones raros. En estudios de expresión heteróloga se ha visto que el uso de codones puede afectar tanto al rendimiento como a la calidad de la proteína cuando un gen se transcribe a altos niveles. En *E. coli* aumentan las incorporaciones erróneas de aminoácidos de proteínas foráneas que se producen a altos niveles (Scorer *et al.*, 1991). La expresión de la cadena Kappa de las inmunoglobulinas se incrementa 50 veces sin cambiar los niveles de mRNA empleando un gen sintético con codones optimizados (Kotula y Curtis, 1991). De los ejemplos anteriores se deduce la existencia de ventajas selectivas a nivel post-transcripcional en la utilización de los codones óptimos. Esta ventaja llega a ser una necesidad cuando la proteína se traduce activamente.

Bennetzen y Hall (1982b), propusieron el índice RSCU (Relative Synonymous Codon Usage) para estimar el uso relativo de los codones sinónimos. El valor de RSCU para un triplete determinado es el número observado respecto al número esperado si todos los codones para ese aminoácido se usasen igualmente (valor esperado del codón relativo a la media para ese aminoácido). Utilizando este índice se describió el uso de codones dentro de una especie para los genes de alta y baja expresión. Sharp y colaboradores (1988), estimaron los RSCU, para 6 especies diferentes (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophyla melanogaster* y *Homo sapiens*), lo que permitió analizar las variaciones en el uso de codones óptimos entre ellas. En 1991 Sharp y Cowe, publicaron una revisión para mas de 500 genes de *S. cerevisiae*, haciendo un análisis por separado de los genes en que existe preferencia por el uso de determinados codones y los que no muestran ninguna preferencia.

Los datos obtenidos indicaron que existían 22 codones óptimos y concuerdan básicamente con los indicados por Bennetzen y Hall (1982b), con la diferencia de que el triplete GCC (Ala) ha resultado no ser un codón óptimo y GAC (Asp), que inicialmente era desestimado, ha resultado ser óptimo.

Lloyd y Sharp (1992) publicaron un estudio sobre el uso de codones en la levadura *Candida glabrata* en el que se aprecian pocas diferencias respecto a *S. cerevisiae*, ambas especies utilizan los mismos codones óptimos, sin embargo, el contenido A-T en tercera posición es mayor en *Candida* debido probablemente a un patrón mutacional diferente.

La caracterización del uso de codones en un organismo es importante por varias razones. Desde un punto de vista práctico, puede ser útil en el diseño de sondas oligonucleotídicas para estas especies, o para mejorar la eficacia de la traducción de una proteína. Desde el punto de vista del desarrollo del conocimiento científico, la elucidación de las bases biológicas del uso de codones en una especie puede ayudar a un conocimiento más generalizado de su biología molecular y de su evolución permitiéndonos conocer el patrón mutacional preferente y la presión selectiva a la que se ven sometidos los diferentes genes para conseguir una traducción eficiente.

OBJETIVOS

OBJETIVOS DEL TRABAJO

La regulación de la expresión de los genes *CYC1* y *CYC7* de la levadura *S. cerevisiae* ha sido objeto de numerosos estudios desde 1930 hasta nuestros días. En este trabajo nos propusimos conocer los mecanismos de regulación que afectan a la expresión de citocromo *c* en otra levadura, *Kluyveromyces lactis*, cuyas características en el metabolismo respiro-fermentativo presentan notables diferencias con *S. cerevisiae*. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

- Clonación por complementación del gen citocromo *c* de la levadura *Kluyveromyces lactis*.
- Secuenciación y comparación de la secuencia con otros genes citocromo *c* previamente descritos.
- Caracterización del mensajero y estudio de su regulación transcripcional.
- Comprobar si los factores reguladores caracterizados en *S. cerevisiae* desempeñan también una función en el control de la expresión del gen citocromo *c* de *K. lactis*.
- Estudio de la expresión del gen clonado en mutantes *rag* de *K. lactis* que presentan alteradas algunas etapas del transporte y utilización de azúcares.

MATERIAL Y MÉTODOS

LÍNEAS CELULARES

BACTERIAS

LÍNEA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>E. coli</i>		
HB101	<i>supE44, hsdS20 (r_B⁻m_B⁻) recA13, ara-14, proA2, lacY1 galK2, rpsL20, xyl-5 mtl-1</i>	Bolivar y Backman, 1979
JM101	<i>supE, thi Δ (lac-proAB)</i> <i>F' [traΔ36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]</i>	Messing, 1979
JM109	<i>recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thi Δ (lac-proAB)</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
MC1061	<i>hsdR, mcrB, ara Δ139, Δ (araABC-leu)7679 Δ lac X 74 galU, galK, rpsL thi</i>	Huynh <i>et al.</i> , 1985

LEVADURAS

LÍNEA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>K. lactis</i>		
NRRL-Y1140	<i>Mat α, Salvaje</i>	Jong and Edwards, 1990
MW98-8c	<i>Mat α, rag1, rag2, uraA, met A1, arg A</i>	Bianchi <i>et al.</i> , 1989
<i>S. cerevisiae</i>		
α-LRI	<i>Mat α, trp1-289, his 3-11, his 3-15, gal1Δ52</i>	Rosenblum-Vos <i>et al.</i> , 1991
a-GHI	<i>Mat α, trp1-289, leu2-3, leu2-112, gal1Δ5</i>	Zitomer
AH10	<i>Mat α, leu 2-3, leu 2-112, trp1-1, his 4-519, ura 3-52, cyc1-1, cyp1-16, Gal⁻, cup3-1::LEU2</i>	Zitomer
ZW13	<i>Mat α, trp1-1, leu2-3, leu2-112, his4-519, cyc1-1, cyp3-1, gal⁻, cyc1-1, cyc7-</i>	Zitomer <i>et al.</i> , 1987

ZW10	<i>Mat α, trp1-1, leu2-3, leu2-112, his4-519, cyc1-1, cyp3-1, gal⁻</i>	Zitomer <i>et al.</i> , 1987
BWG1-7a	<i>Mat α, ade 1-100, his 4-519, leu 2-2, leu 2-112, ura 3-52</i>	Guarente
LPY22	<i>Mat α, ade 1-100, his 4-519, leu 2-2, leu 2-112, ura 3-52, Δ hap1::LEU2, CYC1 Δ UAS2</i>	Guarente
JO1-1a	<i>Mat α, ade 1-100, his 4-519, leu 2-2, leu 2-112, ura 3-52 Δ hap2</i>	Guarente
rox1	aGH1- (rox1 ⁻)	Rosenblum-Vos <i>et al.</i> , 1991
rox4	aGH1-100 (tup1 ⁻)	"
rox5	aGH1-168 (rox 5 ⁻)	"
rox6	α LRI-238 (rox 6 ⁻)	"

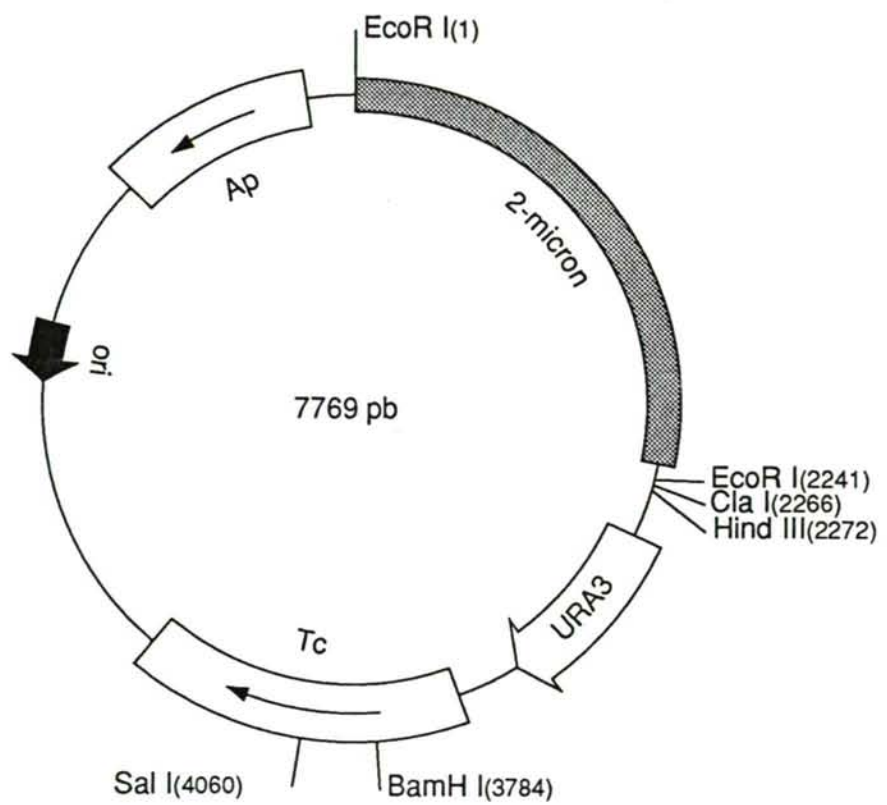
PLÁSMIDOS

CYC1-2.4	Lowry <i>et al.</i> , 1983
pAWJ-1	Walker-Jonah, 1988

VECTORES

YEplac112	Botstein <i>et al.</i> , 1979
YCplac112	Gietz y Sugino, 1988
YEplac24	"
YCplac33	"

En las figuras 4, 5, 6 y 7 se muestran los mapas con las características más notables de cada uno de los vectores utilizados en este trabajo.



YEp24

Figura 4. Vector YEp24.

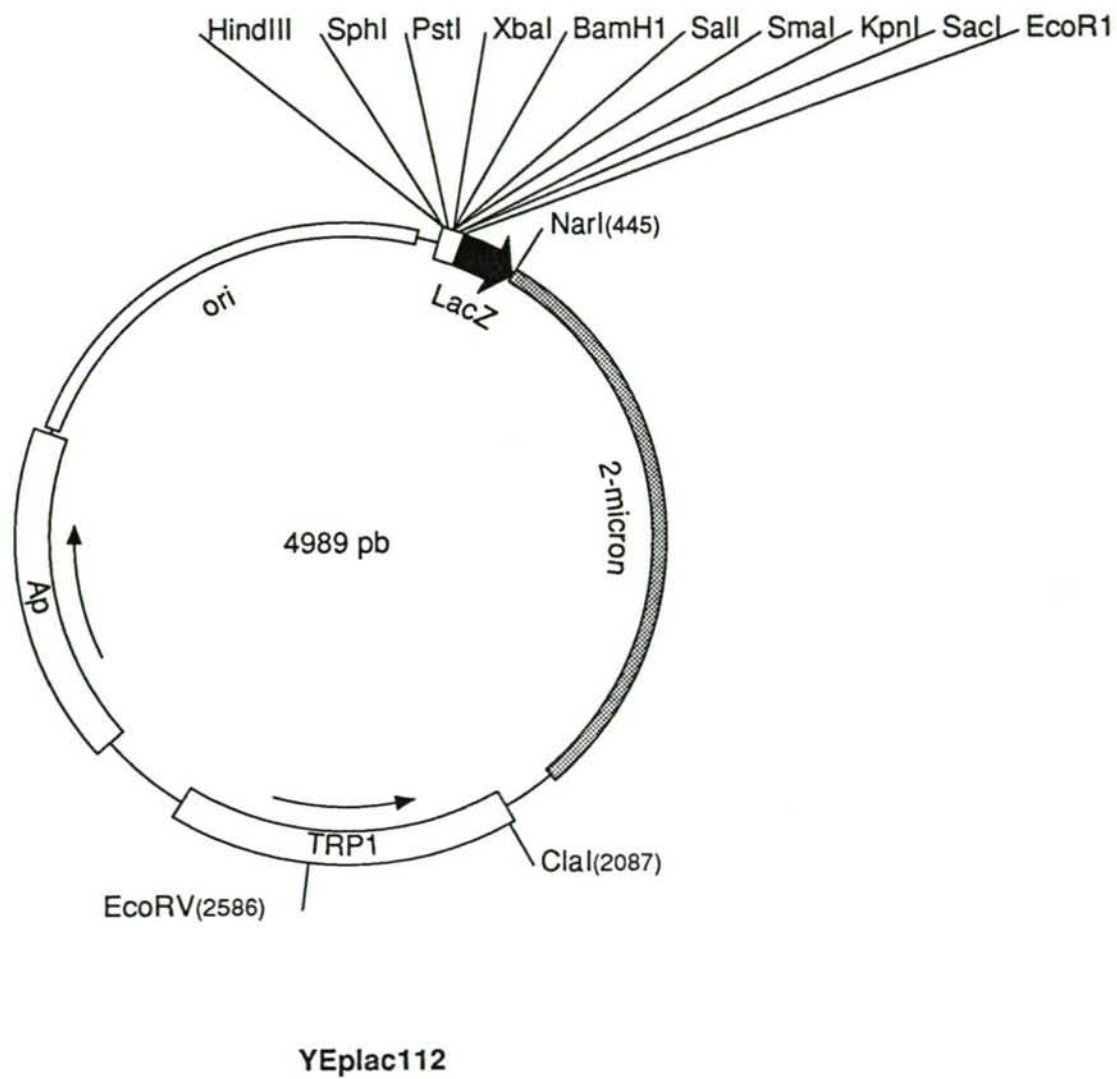


Figura 5. Vector YEplac112.

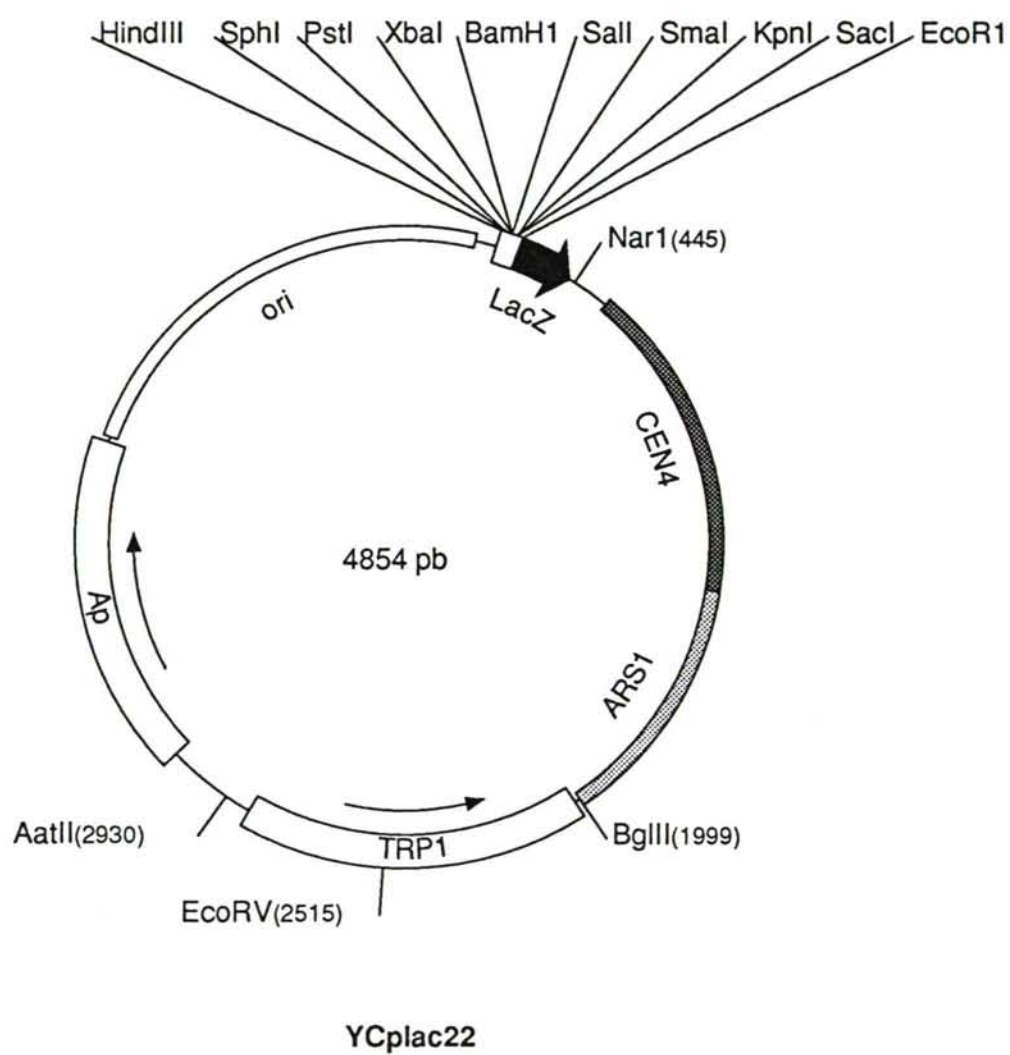


Figura 6. Vector YCplac22

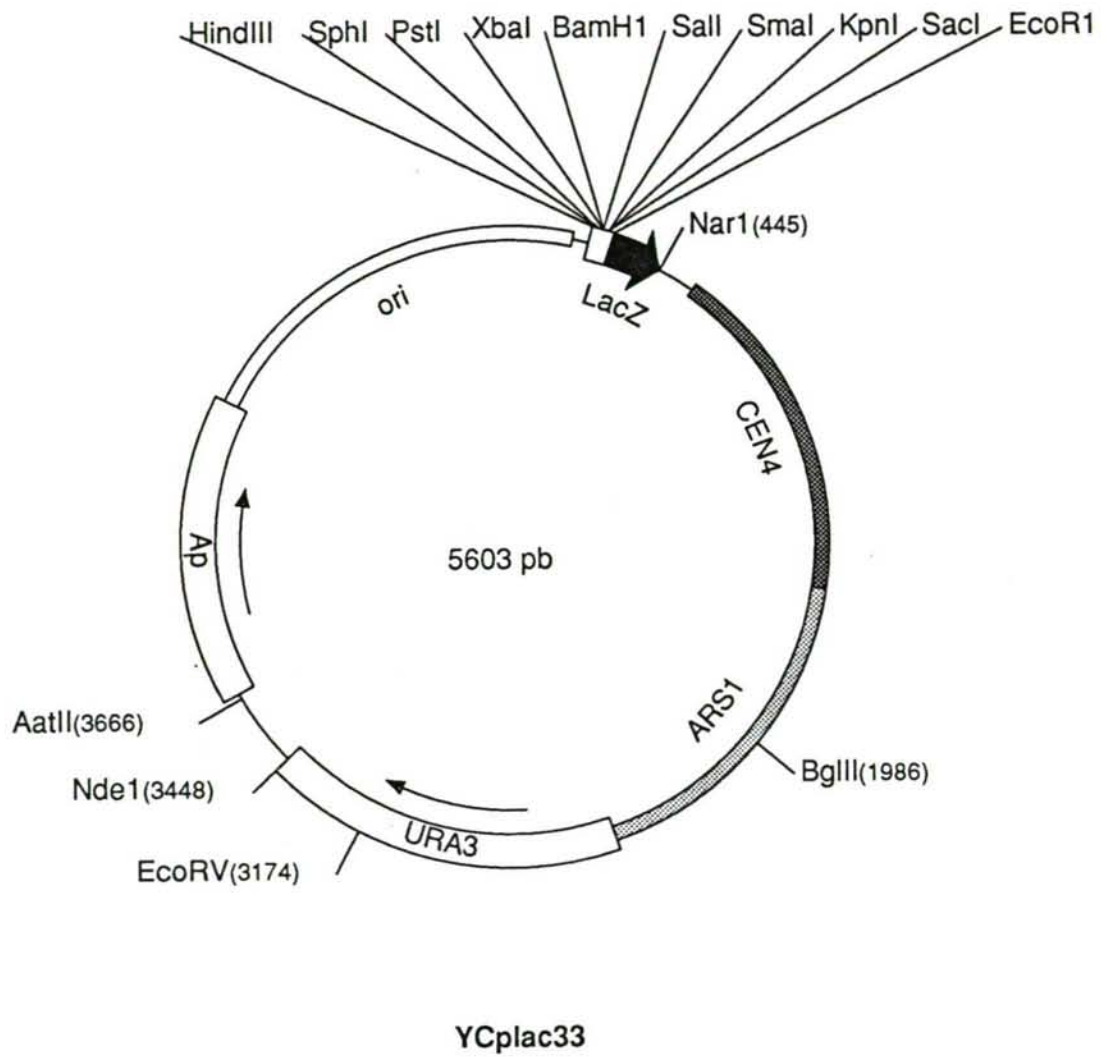


Figura 7. Vector YCplac33

MEDIOS DE CULTIVO

A continuación se describen los medios utilizados para hacer cultivos de bacterias y levaduras. Para la preparación de medios sólidos se adicionó 1,5 % de Bacto-Agar al correspondiente medio líquido. Las soluciones fueron esterilizadas en autoclave por espacio de 20 min a 121° C y una atmósfera de presión.

-MEDIOS PARA CULTIVAR BACTERIAS

LB (medio Luria-Bertani)

1% Bacto-triptona
0,5% Bacto-Yeast-Extract
0,5% NaCl
0,1% Dextrosa

Este es un medio general de crecimiento. Para seleccionar bacterias conteniendo plásmidos con genes de resistencia a antibióticos se suplementó el medio esterilizado con el antibiótico indicado. **LBA** (LB con ampicilina): ampicilina a una concentración final de 40 µg/ml (a partir de una solución stock 40 mg/ml en agua estéril). Medio **LBC** (LB con cloranfenicol) a una concentración final de 25 µg/ml (a partir de una solución stock 25 mg/ml en etanol).

X-Gal

Estas placas se utilizaron para discriminar entre colonias blancas y azules (productoras de β-galactosidasa), a fin de identificar los plásmidos recombinantes por la pérdida, debida a la inactivación insercional del gen LacZ, de la actividad β-galactosidasa.

Antes de proceder a la siembra se extendieron sobre cada placa, 50 µl de una solución 20 mg de X-Gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) / ml de dimetil formamida y 10 µl de una solución de 0,23 mg/ml de IPTG (Isopropil β-D-tiogalactopiranosido).

YT

1% Bacto-triptona
0,5% Yeast -extract
0,5% NaCl

Se utilizó para la siembra de líneas celulares de bacterias y para la preparación de células competentes.

Medio mínimo M9

Para 1 litro:

a 903 ml de agua destilada estéril se añadieron:
48 ml de 20 x sales M9
2 ml de MgSO_4 al 12,3% (p/v)
1 ml de FeSO_4 al 0,05 %
20 ml de casaminoácidos al 10%
20 ml de glucosa al 25%
1 ml de tiamina de concentración 10 mg/ml
5 ml de timina de concentración 2 mg/ml

20 X Sales M9

Para 1 litro:

60 g KH_2PO_4
226 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
20 g NH_4Cl
Esterilizado en autoclave.

-MEDIOS PARA CULTIVAR LEVADURAS:

YPD

Sus componentes son extracto de levadura (Yeast-Extract), Bacto peptona y glucosa (esta última a distintos porcentajes, 0,5-2%, según se tratase de cultivos rutinarios o bien de cultivos para experimentos de expresión génica con objeto de estudiar la regulación por fuentes de carbono).

2% Bacto peptona
1% Extracto de levaduras
2% Dextrosa

YPG

En este medio sólo crecen células con capacidad respiratoria. Se utilizó también para estudios de regulación de la expresión génica por fuentes de carbono.

2% Bactopeptona
1% Extracto de levaduras
2% Glicerol

CM (medio completo)

Se trata de un medio sintético preparado según Lowry *et al.* (1983).

CM-Glucosa

- Mezcla de aminoácidos (-His) 200x, añadir 5ml/l:
 - 2 g/l Arginina
 - 12 g/l Isoleucina
 - 8 g/l Lisina
 - 2 g/l Metionina
 - 2 g/l Treonina
 - 12 g/l Fenil-alanina
- Histidina, Leucina, Uracilo, Adenina y Tirosina (40 mg/l)
- Triptófano (30 mg/l)
- Glucosa 2%

Tras la esterilización, cuando la temperatura del matríz alcanzaba los 60   C se añadía el YNB (ver más adelante) a una concentración final 0,67%.

CM-Glicerol

Se preparó utilizando glicerol al 2% como fuente de carbono en lugar de glucosa.

CM-lactato

Con   cido láctico como fuente de carbono (previamente neutralizado con NaOH) al 2%.

CM-Trp, CM-Ura, CM-Leu

Medio completo eliminando el aminoácido elegido; utilizado para seleccionar levaduras mutantes para los genes relacionados con la biosíntesis de los citados aminoácidos transformadas con plásmidos que contenían los correspondientes genes.

SD (*synthetic dextrose minimal medium*)

Yeast Nitrogen Base (YNB) 0,67%
Glucosa 2%
en H  O destilada

Para algunos experimentos de expresión heteróloga se reemplazó la glucosa por glicerol.

YNB

50 ml/l Vitaminas 300x
100 ml/l sales traza 150x
15 g/l KH_2PO_4
7,5 g/l MgSO_4
1,5 g/l NaCl
1,5 g/l CaCl_2
75 g/l $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

Vitaminas 300x

Biotina 0,6 mg/l
Pantotenato cálcico 120 mg/l
Ácido fólico 0,6 mg/l
Inositol 600 mg/l
Niacina 120 mg/l
p-Aminobenzoico 60 mg/l
Piridoxina 120 mg/l
Riboflavina 60 mg/l
Tiamina 120 mg/l

Sales traza 150x

Ácido bórico 75 mg/l
Sulfato cúprico 6 mg/l
Ioduro potásico 15 mg/l
Cloruro férrico 30 mg/l
Molibdato sódico 30 mg/l
Sulfato de Zinc 60 mg/l

CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS

Para realizar el seguimiento del crecimiento de las diferentes líneas de levaduras se hicieron precultivos de las células en el medio adecuado, durante toda una noche. Los cultivos se inocularon con el precultivo hasta alcanzar una A_{600} de 0,1 y a partir de aquí se hizo un seguimiento del crecimiento celular midiendo la absorbancia del cultivo a 600nm. Esta longitud de onda se utilizó tanto para levaduras como para bacterias.

OBTENCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

- DNA PLASMÍDICO DE BACTERIAS

1. Método de lisis alcalina

Este método se utilizó para la obtención de DNA plasmídico a partir de bacterias, a pequeña (1,5 ml de cultivo) y mediana escala (25 ml de cultivo), con un rendimiento aproximado entre 3 y 20 μg de plásmido respectivamente, dependiendo también de las características del vector.

Se inocularon las células en medio LBA. Tras su crecimiento durante toda la noche se centrifugaron 1,5 ml, en las preparaciones a pequeña escala, de cultivo a 8.000 rpm. y se resuspendieron las células en 100 μl de solución I. Se incubaron 5 min. a temperatura ambiente y se añadieron 200 μl de solución II, recientemente preparada, se mezcló por rápida inversión del tubo y se mantuvieron durante 5 min. en hielo; transcurrido este tiempo se adicionaron 150 μl de solución III que se mezclaron por inversión suave del tubo y de nuevo se hizo una incubación de 5 min. en hielo. Los tubos se centrifugaron a 12.000 rpm. durante 5 min. Para eliminar restos de proteínas que podrían dificultar posteriores manipulaciones del plásmido, el sobrenadante se sometió a una extracción con PCIA (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico) y un posterior lavado con CIA (cloroformo-alcohol isoamílico).

A cada muestra se le añadieron 1.000 μl de etanol al 95%, luego se incubaron 5 min. a -20°C y posteriormente los plásmidos se precipitaron por centrifugación a 12.000 rpm. durante 5 min. Para eliminar restos de sales el sedimento se lavó con 500 μl de etanol al 70% y se precipitó como en el paso anterior. Las muestras se secaron a vacío por espacio de 5 min. y posteriormente se resuspendieron en 25-50 μl de 1xTE.

Con este procedimiento además del DNA se obtiene una considerable cantidad de RNA que se eliminó por tratamiento con RNAasa A, a una concentración final de (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

En las preparaciones a mediana escala se procedió de igual modo que en el apartado anterior, pero partiendo de 25 ml de cultivo y con las soluciones en la proporción

correspondiente. En el caso de la obtención de plásmidos para secuenciación se efectuaron incubaciones de una hora con RNAsa, para eliminar el RNA, seguidas de posteriores purificaciones con fenol-cloroformo y precipitación con etanol.

Preparación de las soluciones:

Solución I:

50 mM Glucosa
10 mM EDTA
25 mM Tris-HCl pH 8,0

Solución II:

0,2 N NaOH
SDS al 1%.

Solución III:

60 % Acetato potásico 5 M
11,5 % Ácido acético glacial

PCIA:

Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico en proporción (96:96: 8)
Equilibrado 2 veces con igual volumen de tampón TE
Guardado en nevera y en oscuridad

CIA:

Cloroformo: alcohol isoamílico en proporción (96:4)

1xTE:

Tris 10 mM
EDTA 1 mM

2. Preparación de DNA plasmídico puro a gran escala

La técnica de purificación de DNA plasmídico mediante gradientes de Cloruro de Cesio-Bromuro de etidio, si bien es laboriosa, tiene la ventaja de producir DNA plasmídico puro que no necesita posteriores tratamientos con RNAsas para su utilización en secuenciación u otros fines.

Partiendo de un cultivo de las bacterias portadoras del plásmido a purificar, se inoculó un litro de medio mínimo M9. Tras media hora de agitación a 37°C, se adicionaron 10 ml de una solución 5mg/ml de ampicilina y una hora mas tarde 5 ml de una solución 10mg/ml de Uridina. Los cultivos crecieron hasta alcanzar una absorbancia a 550 nm comprendida entre 0,5 y 0,7. Llegados a este punto se añadieron 5 ml de una solución

de 34 mg/ml (en etanol al 95%) de cloranfenicol y se continuó el cultivo durante toda la noche.

Las células se recogieron por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min. y a una temperatura de 4°C. El botón celular se lavó dos veces en 100 ml de tampón TE. Posteriormente las células se resuspendieron en 13 ml de la solución Tris-sacarosa y se añadieron 2 ml de una solución 10 mg/ ml de lisozima; tras mezclar suavemente, las muestras se incubaron en hielo durante 10 min. Transcurrido este tiempo se adicionaron 0,35 ml de EDTA 0,5 M que fueron mezclados con suavidad y se procedió a una segunda incubación de 10 min en hielo; seguidamente se añadieron 7 ml de tampón TX-100 y se agitó por inversión hasta la observación de un aumento en la viscosidad. Tras una incubación de 15 min. a 0°C, las muestras se centrifugaron a 30.000 rpm durante 90 min. y a 4°C en una ultracentrífuga Beckman.

Al sobrenadante recogido se le añadió 1 ml de sarcosil (N-Laurilsarcosina) al 10% que fué mezclado por agitación, 1 g de ClCs y 0,06 ml de una solución 10 mg/ml bromuro de etidio por ml de sobrenadante; generalmente se ajustó el volumen a 23 ml (con TE) y se añadieron 1,38 ml de bromuro de etidio y 23 g de CsCl. Las muestras se centrifugaron en el rotor VTi-50 (Beckman) a 40.000 rpm durante un tiempo superior a 16 horas a 10°C. En el gradiente formado aparecen 2 bandas visibles al UV, la inferior, conteniendo el plásmido en forma circular y sin mellas, fué sustraída con ayuda de una aguja hipodérmica y de nuevo se centrifugó durante toda la noche en el rotor VTi-65 (Beckman) a 50.000 rpm y a una temperatura de 10°C.

A la mañana siguiente se aisló la banda fluorescente conteniendo el plásmido y se procedió a la eliminación del bromuro de etidio; la muestra se mezcló con igual volumen de isopropanol y las fases se separaron por centrifugación a 3.000 rpm, siendo eliminada la fase del alcohol (fase superior).

Tras dializar durante toda la noche frente a 1xTE en cámara fría, el DNA se dejó precipitar a -20°C varias horas en doble volumen de etanol al 95%, añadiendo 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M. Posteriormente fue centrifugado a 12.000 rpm 10-15 min. y lavado 2 veces en etanol al 70%. Una vez secado al vacío se resuspendió en 500 ml de tampón TE y se determinó la concentración de plásmido por espectrofotometría.

Preparación de soluciones:

Tris 1 M pH 8

Tritón X-100 al 10% (p/v) en agua estéril

Sarcosil al 10% (p/v) en agua estéril

EDTA 0,5 M pH 8 y EDTA 0,25 M pH 8

Tris-sacarosa:

Sacarosa al 25% (p/v)
0,05 M Tris pH 8

Tampón TX-100:

Tris-HCl 0,05 M pH 8
Tritón X-100 al 0,1% (v/v)

- RESCATE DEL PLÁSMIDO DE LEVADURAS

Las células de un cultivo de 1,5 ml en YPD se precipitaron y se lavaron con sorbitol 1 M. Para preparar los protoplastos las células se resuspendieron en 800 µl de una solución 0,9 M Sorbitol, 50 mM NaHPO₄ pH 7,5 y 14 mM β-mercaptoetanol, en la que se trataron con 50 µl de zimolasa (5 mg/ml en agua) durante 1 hora a 30°C. Tras precipitar y resuspender en 500 µl de EDTA 50 mM pH 8, SDS 0,3%, las muestras se incubaron a 65°C por espacio de 20 min., posteriormente se añadieron 100 µl de acetato potásico 3 M pH 4,8. Tras 2 horas en hielo, se centrifugó 5 min. El sobrenadante se precipitó con etanol al 95% (0,4 ml de etanol/0,6 ml sobrenadante) y fué lavado con etanol al 70%. Las muestras se secaron, se resuspendieron en 0,4 ml de 1xTE y se sometieron a una extracción con PCIA y CIA; de nuevo se precipitó el DNA y una vez resuspendido en TE se utilizó para transformar *E. coli*. A partir de las colonias transformantes se preparó DNA plasmídico por la técnica anteriormente descrita. Esta técnica es aplicable a los plásmidos que son capaces de replicarse en bacterias y levaduras (*shuttle-vectors*).

- DNA GENÓMICO DE LEVADURAS

Las células de un cultivo de 100 ml en fase estacionaria se centrifugaron y se lavaron con 10 ml de una solución 1 M de sorbitol, 0,1 M EDTA. Para la obtención de protoplastos se resuspendieron en 10 ml de una solución 0,9 M sorbitol, 50 mM EDTA, 50 mM, NaHPO₄ pH 7,5 y 14 mM β-mercaptoetanol. A continuación se añadieron 0,5 ml de una solución 5 mg/ml zimolasa y se agitaron suavemente durante 30 min. a 30°C. Posteriormente se añadió SDS a una concentración final del 1% y se sometieron a una incubación de 20 min. a 65°C sin agitación, tras lo cual se procedió a sucesivas extracciones con PCIA hasta conseguir una interfase libre de proteínas. La fase acuosa se

potásico a una concentración final 0,83 M. Transcurrido este tiempo se centrifugó 15 min a 10.000 rpm. El sobrenadante se precipitó con 1,5 volúmenes de etanol al 95% a 5.000 rpm durante 5 min. El precipitado se lavó en etanol al 70% y se resuspendió en 1XTE.

- CURACIÓN DEL PLÁSMIDO DE LA LEVADURA

Para la eliminación del plásmido de las levaduras transformadas se procedió a cultivar las células en YPD. Durante 3 días se hicieron sucesivas resiembras del cultivo, tras lo cual se hicieron las diluciones pertinentes para sembrar en placa YPD y obtener colonias aisladas. Las colonias obtenidas fueron resembradas simultáneamente en placas YPD y placas selectivas. Aquellas colonias que habían perdido la capacidad de crecimiento en el medio selectivo se consideraron curadas del plásmido.

- RNA TOTAL

La extracción de RNA total se realizó según el método de Zitomer y Hall (1976), el agua con la que se prepararon las soluciones fue previamente tratada con DEPC como describen Sambrook y colaboradores (1989). Los cultivos de levaduras se realizaron en medios con la fuente de carbono deseada hasta que alcanzaron una A_{600} comprendida entre 0,5 y 0,9.

Para los experimentos en anaerobiosis los cultivos se suplementaron con 20 $\mu\text{g/ml}$ de ergosterol y 0,2% Tween80, requeridos para la biosíntesis de ácidos grasos en condiciones de falta de oxígeno. Las condiciones anaerobias se consiguieron por dos métodos: i) en jarras de anaerobiosis utilizando un generador de anaerobiosis Gas-Pack de Bioré; ii) mediante burbujeo con nitrógeno, en este caso el burbujeo se inició cuando las células alcanzaban en aerobiosis una absorbancia de 0,4 a 0,5, poniéndolas a continuación durante dos horas en anaerobiosis (figura 8). Los cultivos se mantuvieron en hielo 15 min. antes de abrirlos para asegurar el cese del crecimiento y la transcripción antes de exponer las células a un ambiente con oxígeno.

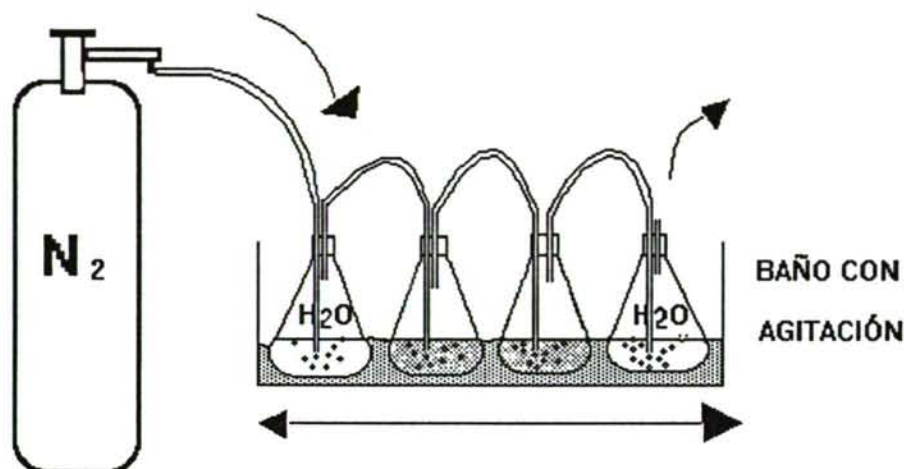


Figura 8. Esquema de cultivo de levaduras en condiciones anaerobias mediante burbujeo con nitrógeno.

Para los experimentos con hemo, se añadió 1,17 ml de una solución 4 mg/ml de hemina en etilén-glicol por cada 100 ml de cultivo, según describen Sambrook y colaboradores (1989).

Las células se centrifugaron en frío, se lavaron en 1XRE, (0,1 M Tris, 0,1 M LiCl, 0,1 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoetanol, pH 7,4) y se siguió el protocolo descrito por Zitomer y Hall, que consiste en la disrupción celular con perlas de vidrio, en 9-10 pulsos de 20 seg. de agitación que se alternan con incubaciones en hielo, a continuación se realizaron extracciones con PCIA en presencia de SDS y precipitación de las muestras con 2,5 volúmenes de etanol al 95%. Las muestras se lavaron en etanol al 70% y una vez secas se resuspendieron en H₂O bidestilada estéril.

- RNA POLI-A

Partiendo del RNA total extraído por el procedimiento explicado en el apartado anterior, el RNA poli-A se obtuvo utilizando el KIT de purificación de mRNA de Pharmacia.

MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEÍCOS

Medida de la concentración de DNA

Se tomaron 5 μ l de la preparación de DNA, libre de RNA, y se llevaron a volumen de 1ml con agua estéril. Las mediciones se efectuaron en un espectrofotómetro (Shimadzu, UV-160A) utilizando cubetas de cuarzo de 1 ml. Se midió la absorbancia de las muestras a 260 y 280 nm. La concentración real se calculó sabiendo que $A_{260}=1$ indica una concentración de 50 μ g /ml de DNA. La relación A_{260}/A_{280} nos indica la calidad de la muestra para una preparación de DNA sin impurezas este cociente toma un valor de 1,8 (Sambrook *et al.*, 1989).

Cuando la muestra contenía RNA se realizó una valoración aproximada de la cantidad de plásmido por comparación de la intensidad de fluorescencia de las bandas de la muestra con el marcador de pesos moleculares de concentración conocida (0,25 μ g/ μ l).

Medida de la concentración de RNA

Conocer la concentración del RNA tiene una importancia primordial en los estudios de Northern blot. Las medidas espectrofotométricas de RNA se hicieron empleando 4 μ l de muestra para un volumen final de 1 ml en agua estéril; se midió la absorbancia de las muestras a 260 y 280 nm. Para la determinación de la concentración de la muestra se tuvo en cuenta que $A_{260}=1$ equivale a 40 μ g/ml de RNA y la relación A_{260}/A_{280} ha de tomar un valor de 2 (Sambrook *et al.*, 1989).

TÉCNICAS DE MODIFICACIÓN DEL DNA

Digestiones del DNA con endonucleasas

Tanto el DNA plasmídico como el genómico fueron digeridos con endonucleasas de restricción de por Boehringer-Manheim, para cada enzima se utilizó el

tampón recomendado y suministrado por los vendedores. Las digestiones transcurrieron por espacio de 2-3 horas a 37°C (las digestiones con *Sma*I se hicieron a 25°C).

Relleno de extremos cohesivos

Para rellenar los extremos cohesivos generados al cortar con enzimas de restricción, se utilizó el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (Sambrook *et al.*, 1989).

El DNA se llevó a un volumen final de 20 µl en tampón para Klenow (0,05 M Tris-HCl pH 7,5; 0,01 M MgCl₂; 0,1 mg/ml de BSA; 0,1 mM DTT). Se añadieron 0,5 µl de una solución 2 mM de nucleótidos y 2 unidades de Klenow; la reacción se mantuvo a 37°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo se inhibió la enzima mediante la adición de 2 µl de EDTA 0,25M; las muestras se llevaron a un volumen de 100 µl y se sometieron a extracción con PCIA y CIA, precipitación en presencia de acetato sódico y lavados con etanol. El DNA se resuspendió en agua estéril y generalmente se utilizó en reacciones de ligamiento con otros fragmentos de extremos romos.

Reacciones de ligamiento

Para las reacciones de ligamiento se utilizó la T4 ligasa de Boehringer y el tampón suministrado con la enzima. Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 10 ó 20 µl. La cantidad de enzima osciló entre 0,5 unidades en el caso de extremos cohesivos y 2 unidades para extremos romos. Las reacciones se realizaron durante la noche a 4°C.

-TÉCNICAS DE MARCAJE

1- Marcaje extremos 5':

El método consiste en obtener los extremos 5'P marcados con ³²P. Para ello los extremos 5' fosfato del fragmento de DNA que se va a marcar se eliminan con fosfatasa alcalina; el tratamiento con la enzima así como su posterior inactivación se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de los vendedores (Boehringer). Con objeto de conseguir un fragmento con sólo un extremo marcado, el DNA desfosforilado fué digerido con un segundo enzima de restricción generando dos fragmentos con un extremo 5' fosforilado y por consiguiente, no susceptibles de ser marcados por la polinucleótido

kinasa en este extremo. El DNA que iba a ser utilizado como sonda se aisló de geles de agarosa según el procedimiento que se describe más adelante.

Para el marcaje radioactivo se utilizó la polinucleótido kinasa de Boehringer y dATP ($\gamma^{32}\text{P}$) de Amersham. Después de una hora, el DNA marcado se separó del isótopo no incorporado pasándolo por una columna de Sephadex-G50, como describe Sambrook y colaboradores (1989), las fracciones marcadas fueron precipitadas con 1/10 del volumen de LiCl y dos volúmenes de etanol al 95%, tras ser lavadas y secadas al vacío se resuspendieron en 1XTE. Este marcaje fue el empleado en los experimentos de digestión con nucleasa S1.

2-Marcaje por *Random-Primed*

- Marcaje radioactivo:

Se utilizó el método descrito por Feinberg y Vogelstein (1983,-84) utilizando ($\alpha^{32}\text{P}$) dATP como nucleótido marcado. La reacción se llevó a cabo durante 3 horas.

- Marcaje con digoxigenina:

Los marcajes no radioactivos se realizaron por el mismo método pero utilizando Digoxigenina-11-dUTP, suministrada en el Kit de marcaje y detección con digoxigenina de Boehringer-Manheim. Los marcajes se realizaron toda la noche y para el Northern blot se utilizaron 2 μg de DNA por sonda.

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

Se prepararon células competentes de *E. coli* partiendo de un cultivo fresco con una A_{600} de 0,6. Las células se lavaron en 15 ml de NaCl 10 mM, se resuspendieron en 25 ml de CaCl_2 100 mM a 0°C y se incubaron en hielo por espacio de 20 min. Tras una centrifugación a 5.000 rpm se resuspendieron en 5 ml de Cl_2Ca , en hielo y se añadieron otros 5 ml de glicerol al 30% estéril. Las células se repartieron en alícuotas y se congelaron a -70°C .

En el momento de la transformación (Hanahan, 1983) se tomaron 200 μl de células competentes recién descongeladas que se incubaron en hielo en 800 μl de CaCl_2 100 mM y 2-5 μl del DNA transformante. Al cabo de los 30 min. de incubación en hielo,

las células fueron sometidas a un choque térmico de 42°C por espacio de 2 min. tras lo cual se añadieron 4 ml de medio LB y se incubaron a 37°C durante 90 min. antes de sembrarlas en placas selectivas con ampicilina.

TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS

Para la transformación de levaduras se utilizó el método de Klebe y colaboradores (1983). Se partió de 10 ml de células de levadura que fueron precipitadas y lavadas en 5 ml de una solución 1M sorbitol, 10 mM bicina, 3% etilén glicol, 1,25 M KCl, 30 mM de CaCl₂ pH 8,35 y DMSO 5%). Las células se resuspendieron en 0,2 ml de esta solución, a continuación fueron congeladas en hielo seco por espacio de 10-15 min., en este tiempo se les añadió el DNA plasmídico transformante en un volumen de 60-80 µl; posteriormente fueron sometidas 5 min. a un choque térmico a 37°C con agitación fuerte en un baño de agua. Tras añadir 1,5 ml de solución B (PEG 1.000 al 40%, bicina 200 mM pH 8,35) se incubaron a 30°C durante 1 hora; transcurrido este tiempo se centrifugaron y lavaron en 1,5 ml de solución C (NaCl 0,15 M, Bicina 10 mM pH 8,35). Las células se sembraron en placas selectivas adecuadas.

TÉCNICAS DE ELECTROFORESIS

Los ácidos nucleicos poseen grupos ionizables que en disolución les confieren carga eléctrica. Esta propiedad permite separarlos por su migración en un campo eléctrico, que a su vez se verá condicionada por el peso molecular de las moléculas. La velocidad de migración es inversamente proporcional a la resistencia que aumenta con la longitud del soporte. Además, los geles constituyen un tamiz formado por cadenas moleculares entrelazadas, este tamiz hace que el movimiento de las grandes moléculas se vea dificultado en el campo eléctrico (Williams y Wilson, 1981).

- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

La agarosa en solución acuosa, fundida y posteriormente enfriada, genera un gel por formación de puentes de hidrógeno. Los geles de agarosa tienen un menor

poder de resolución que los de poliacrilamida, sin embargo, permiten un mayor rango de separación.

Geles no desnaturalizantes:

Se utilizaron para la separación de fragmentos de DNA, con objeto de realizar mapas de restricción, Southern blots, comprobar nuevas construcciones en plásmidos, o bien para separar fragmentos específicos que fueron rescatados del gel, con objeto de ser utilizados como sonda o subclonados.

Se prepararon geles a porcentajes de agarosa comprendidos entre 0,7 y 1,2% dependiendo de las diferencias de tamaño entre los fragmentos a separar. Los geles se prepararon según describen Sambrook y colaboradores (1989), utilizando el tampón Tris-EDTA-Acetato. En el caso de geles para comprobación de digestiones, antes de verter el gel, se añadieron 3 μ l de la solución stock (5 mg/ml) del agente intercalante bromuro de etidio.

Tras añadir 1/10 del volumen de las muestras de tampón de carga (Sambrook *et al.*, 1989), éstas se cargaron con el gel sumergido en el tampón de electroforesis (Tris 0,04 M; EDTA 1 mM; Acetato sódico 20 mM, ácido acético 30 mM). Como referencia de tamaños se utilizó el marcador de pesos moleculares número III de Boehringer Mannheim.

Las electroforesis a voltages entre los 60V (para geles pequeños) y los 100 V se efectuaron por espacio de 1-4 horas, dependiendo también del tamaño de los fragmentos a separar.

En caso de no haber sido teñidos previamente, los geles se tiñeron por inmersión en una solución de agua destilada o tampón de electroforesis con 4-12 μ l de una solución stock de bromuro de etidio (5 mg/ml), durante 5 min. Posteriormente se destiñeron en agua destilada, generalmente por espacio de unos seg. La visualización de las muestras se realizó en un transiluminador para UV de FOTODYNE. Para fotografiar los geles teñidos se utilizó la película Kodak-X-Plus, con una exposición de 10-15 seg. y una apertura de diafragma de 4.

Geles desnaturalizantes

La separación de RNA en función de su tamaño requiere la utilización de agentes desnaturalizantes como el formaldehído o el glioxal, así como una mayor concentración de agarosa. En este trabajo se han empleado los geles de formaldehído para tales fines, en el apartado de Northern blot se explica más detalladamente el protocolo.

-GELES DE POLIACRILAMIDA

Geles no desnaturalizantes

Se utilizaron geles de poliacrilamida no desnaturalizantes (Sambrook *et al.*, 1989) para la visualización y aislamiento en su caso, de fragmentos de DNA de muy pequeño tamaño (menores de 500 pb) y por tanto difícilmente detectables en geles de agarosa normales. Los geles de poliacrilamida también se prepararon a diferentes concentraciones normalmente del 4 al 10%, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar.

Geles desnaturalizantes

Las electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes se emplearon para las técnicas de *SI mapping* y secuenciación, los geles se prepararon al 8% de acrilamida y urea 7 M según Sambrook y colaboradores (1989). Los geles se prepararon en una célula de secuenciación de Biorad. Para las electroforesis se utilizó fuente de alto voltaje de ISCO.

-VISUALIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los procedimientos de tinción que se citan a continuación son para geles de poliacrilamida a concentración de al menos 6%, menores concentraciones hacen mucho mas difícil la manipulación del gel.

Tinción con bromuro de etidio

El bromuro de etidio es un fluorocromo intercalante que se une específicamente al DNA o al RNA, por tanto permite la visualización de estos ácidos nucleicos al UV (260nm).

Una vez separados de los soportes de electroforesis, los geles fueron teñidos de igual modo que los geles de agarosa. Esta tinción no daña excesivamente al DNA y permite la escisión de las bandas del gel para su posterior purificación.

Tinción de plata

Se utilizó para detectar bandas de muy pequeño tamaño ya que este método proporciona una mayor sensibilidad. Para ello se sumergieron los geles en 200 ml de una solución 0,1% ácido acético, 10% etanol por espacio de media hora y con agitación. Se lavaron en agua desionizada unos segundos y se incubaron otra media hora en una solución de NO_3Ag al 0,1%, los geles se lavaron dos veces en agua y se cubrió el gel con una solución 1,5% de NaOH, 0,5% de formaldehído. Aproximadamente a los 10 min. se visualizaron las bandas. Los geles se aclararon de nuevo en agua, se sellaron en plásticos y tras su estudio se almacenaron en nevera.

AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE DNA

A partir de geles de agarosa

Para el aislamiento de fragmentos de DNA (de tamaños mayores de 500 pb) con objeto de utilizarlos posteriormente como sondas, o bien para su posterior clonación en vectores, utilizamos el Kit *Gene Clean* BIO-101, siguiendo el protocolo indicado por los vendedores. El rendimiento es aproximadamente de un 90%.

A partir de geles de poliacrilamida

Una vez escindida la banda conteniendo el fragmento de DNA de nuestro interés, se procedió a deshacer la poliacrilamida mecánicamente, presionándola con una punta de pipeta gruesa dentro de un tubo Eppendorf. Tras lo cual se añadieron 500 µl de 1XTE y se incubaron los tubos con agitación a 37°C durante 2-3 horas. El DNA disuelto en el tampón se centrifugó a 13.000 rpm. durante 10 min., quedando separado de la acrilamida. Posteriormente se hizo una extracción con fenol-cloroformo, seguida de una precipitación con etanol. Las muestras se resuspenden en el volumen deseado de H₂O bidestilada esteril, o bien en 1XTE.

SOUTHERN BLOT

Los experimentos de Southern blot se realizaron siguiendo el método de Southern (1975). Partiendo de DNA genómico, o plasmídico, digerido con enzimas de restricción se llevaron a cabo electroforesis en geles de agarosa para separar los fragmentos en función de su tamaño. Los geles fueron tratados con una solución de desnaturalización (NaOH 0,4 M, NaCl 0,6 M) por espacio de 30 min., luego fueron neutralizados con una solución 0,5 M Tris-ClH, 1,5 M NaCl pH 7,8 y el DNA fué transferido por capilaridad a una membrana de nylon, *Gene Screen Plus*, a 4°C durante toda la noche. En estos experimentos el DNA se fijó a la membrana en un horno a 80°C por espacio de 2 horas.

Las membranas se prehibridaron en un baño con agitación por espacio de una hora a 60°C en tampón compuesto por: Tris-HCl 100 mM, 2 mM EDTA, 0,3 M NaCl pH 7,8, sulfato de dextrano al 10%, NaH₂PO₄ 40 mM, Na₂HPO₄ 40 mM, 0,16% SDS, 5X Denhardt's y 5 mg de DNA de salmón sonicado. Las hibridaciones se realizaron durante la noche añadiendo a 10 ml de solución de prehibridación la sonda marcada radioactivamente por *random primed*, la temperatura fué también de 60°C. Los lavados se hicieron con una solución 0,05 M Tris; 1 mM EDTA pH 7,8; NaCl 0,15 M y SDS 0,25%, un primer lavado a 60°C por espacio de 30 min. y dos lavados de 10 min. a temperatura ambiente. Los filtros se sometieron a autorradiografía con película Agfa-Curix durante toda la noche a -70°C.

Denhardt's 100X:

EDTA 0,01M

2% PVP-360
2% Ficoll
2% Seroalbúmina bovina fracción V

NORTHERN BLOT

Partiendo de RNA total obtenido según se indica en el apartado correspondiente se efectuaron electroforesis en geles de formaldehído. Estos geles se prepararon con agua estéril previamente tratada con DEPC para evitar contaminaciones por RNAsas, con una concentración de agarosa de 1,5% y utilizando como buffer 1XMOPS. Cuando la agarosa fundida alcanzó una temperatura aproximada de 60°C, se añadió el formaldehído a concentración final del 6%. Una vez vertidos se dejaron solidificar unos min. a temperatura ambiente y luego se guardaron a 4°C durante aproximadamente 2 horas antes de cargar las muestras.

Las muestras fueron desnaturalizadas antes de ser cargadas en el gel. Con este objeto a 10 µl de una solución conteniendo del orden de 40-50 µg de RNA, se le añadieron 20 µl de una solución compuesta por 8.9% formamida, 24% formaldehído y 2XMOPS. Posteriormente se desnaturalizaron por calentamiento a 65°C durante 5 min. e inmediatamente a continuación se enfriaron en hielo. Se cargaron las muestras con 1/10 del volumen de muestra de tampón de carga, en el gel de formaldehído sumergido en el tampón de electroforesis (1xMOPS) Las electroforesis transcurrieron durante toda la noche a 60 voltios, o bien durante 4 horas a 70 voltios en el procedimiento optimizado para digoxigenina. Como referencia de pesos moleculares utilizamos el marcador I de RNA y III de DNA de Boehringer-Manheim.

Tras la electroforesis los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y lavado con agua tratada con DEPC entre 5 y 10 min. La tinción con bromuro de etidio prácticamente no repercute en el resultado final y por contraposición presenta dos ventajas: permite comprobar la integridad de las muestras y la igualdad de carga en los distintos pocillos. Los geles fueron fotografiados en las mismas condiciones que se describieron en el apartado anterior. El posterior estudio de los negativos con un equipo de análisis de imagen permitió normalizar los resultados respecto al valor de carga.

Tampones utilizados para las electroforesis:

20X MOPS:

0,4 M MOPS
 0,1 M Acetato sódico anhidro
 20 mM EDTA
 Preparado con agua estéril y guardado en oscuridad.

10X Tampón de carga:

0,3% Azul de bromofenol
 0,3% Xilen Cianol
 40% Glicerol en 1xTE

1XTE:

10 mM Tris-ClH pH 7,5
 1 mM EDTA pH 8

Las transferencias se hicieron en 10XSSC por capilaridad durante toda la noche o mediante vacío (utilizando el sistema VacuGene de Pharmacia) durante 1 hora. Los experimentos de Northern blot (Alwine *et al.*, 1977) se realizaron siguiendo dos protocolos. En los primeros experimentos utilizamos membranas *Gene Screen Plus*, fijación a 80°C, sondas marcadas radioactivamente y las mismas soluciones de hibridación que para el Southern, hibridando a 61°C por espacio de 6 horas. Al pasar a utilizar el marcaje con digoxigenina cambiamos de membrana y utilizamos membrana de Nylon NY13N de Schleicher and Schuell; a partir de este momento las fijaciones después de la transferencia al vacío se hicieron por exposición al UV durante 3-5 min. Las prehibridaciones se hicieron en una solución 10 mM ácido maléico, 10 mM NaCl, pH 7,5, 5XSSC, 1% reactivo de bloqueo de Boehringer, SDS al 0,02% y 5 mg de DNA de salmón sonificado. Las hibridaciones se hicieron en 2 ml de esta solución con 2 mg de una sonda marcada con digoxigenina según se explicó anteriormente. Tras 6-8 horas de hibridación a 61°C se efectuó un lavado de 5 min. a la misma temperatura y dos de 5 min. a temperatura ambiente en 50 ml de 2XSSC y 0,1% de SDS.

El desarrollo de color se hizo siguiendo las instrucciones de los vendedores. Tanto las membranas coloreadas de los Northern no radioactivos como las autorradiografías fueron fotografiadas utilizando la película Kodalith ortho film (Kodak).

20XSSC:

3 M NaCl
 0,3 M citrato sódico.

CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN

La cuantificación de los niveles de mRNA se hizo utilizando un espectrofotómetro Beckman (DU-serie-70) haciendo barridos lineales (a una absorbancia de 640 nm y 60 lecturas por mm) sobre las bandas de los correspondientes mRNAs en los negativos.

PUNTOS DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN POR S1

Para la determinación del punto de inicio de la transcripción del gen *KICYC1* se siguió el método de digestión con nucleasa S1 (Boehringer) según describen Favorolo y colaboradores (1980).

El método se basa en la formación de heteroduplex DNA-mRNA que son sometidos a digestión con nucleasa S1. Esta enzima digiere cadenas simples de ácidos nucleicos pero no el DNA bicatenario ni los duplex formados por el DNA y su mRNA complementario; la longitud del fragmento protegido de la digestión se corresponde con la distancia desde el punto marcado hasta el punto de inicio de la transcripción. La longitud de este fragmento se estima mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (Sambrook *et al.*, 1989) seguidos de autorradiografía.

SECUENCIACIÓN

Las reacciones de secuenciación se realizaron empleando el método de terminación de la cadena con didesoxirribonucleótidos trifosfato (ddNTPs) (Sanger *et al.*, 1977). Los fragmentos que se iban a secuenciar fueron clonados en el sitio de clonaje múltiple (MCS) del plásmido YEplac112 (Gietz y Sugino, 1985); cualquier DNA clonado en este plásmido puede ser secuenciado en ambas hebras utilizando los *primers* Universal y Reverse, puesto que el vector contiene las secuencias complementarias de ambos.

Todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando los primers, dNTP y ddNTP de Boehringer-Mannheim y la T7 DNA polimerasa de Pharmacia.

Preparación del molde:

Los moldes se obtuvieron a partir de DNA bicatenario, mediante una desnaturalización alcalina según se describe a continuación:

4 µg de DNA obtenido a partir de gradientes ClCs-Bromuro de Etidio se llevaron a un volumen de 20 µl con agua. Tras añadir 2 µl de una solución de NaOH 2 M y EDTA 2 mM, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min., se enfriaron en hielo y se mezclaron para su precipitación con 3 µl de acetato amónico, 7 µl de agua y 75 µl de etanol al 95%. Tras centrifugación, lavado con etanol al 70% y secado al vacío se resuspendieron en 5 µl de agua. En la reacción de secuenciación se emplearon los 5 µl.

Gel de secuenciación:

Los geles se prepararon al 1% (Sambrook *et al.* 1989) en una célula de secuenciación de Biorad. Las soluciones para el gel de secuenciación se prepararon también según los citados autores. Las muestras se incubaron a 90-100°C por espacio de 5 min. y se mantuvieron en hielo hasta ser cargadas en el gel. La electroforesis se realizó a 1.700 voltios. Cuando el azul de bromofenol entraba en el buffer se hacía la segunda carga de las muestras y así hasta completar 3-4 cargas por gel. La autorradiografía se efectuó sobre una película de rayos X, Agfa Curix RP2, durante toda la noche.

Las películas se revelaron 5 min. en revelador RX Agfa G-150, se lavaron 1 min. en H₂O y se fijaron 5 min. en fijador Agfa-G350.

Reacciones de secuenciación:**- Hibridación del cebador con el DNA molde:**

Se mezclaron los 5 µl de DNA molde con 5 µl de tampón T7 y 1 µl de cebador (2,5 µg/ml), se incubaron a 20°C durante 15 min., posteriormente se mantuvieron en hielo hasta el inicio de la reacción de marcaje.

-Reacción de marcaje:

Los marcajes se preparon poco antes de cargar las reacciones en el gel. A la mezcla molde-cebador en hielo se le añadieron:

- 2 µl de 0,1 M DTT
- 2 µl de mezcla de marcaje diluida
- 1 µl ³²P-α-dATP
- 1 µl de T7 polimerasa diluida

Las reacciones de marcaje se incubaron durante 5 min. a 20°C.

Reacción de terminación:

Mientras se desarrollaban las reacciones de marcaje, se prepararon cuatro tubos, cada uno de ellos con 2,5 µl de una de las mezclas de terminación, ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP. Estos tubos se incubaron a 37°C durante los últimos min. de la reacción de marcaje.

A cada uno de ellos se le añadieron 3,5 µl de la reacción de marcaje y se incubaron a 37°C durante 5 min. Las reacciones se pararon con 4 µl de solución de paro y se mantuvieron en hielo hasta el momento de ser cargadas en el gel.

Soluciones de las reacciones de secuenciación:

El tampón de la sequenasa, la solución de paro y la solución stock 10 mM dNTPs se prepararon según Sambrook y colaboradores (1989).

Mezcla de marcaje para ³²P dATP: diluir 10 µl de una solución stock 50X en 490 µl de agua.

Mezcla de marcaje 50 X:

0,9 ml agua estéril
50 µl de Tris-HCl 1M pH 7,5 (50 mM)
0,49 ml de H₂O
7,5 µl dGTP 10 mM (75 mM)
7,5 µl dCTP 10 mM (75 mM)
7,5 µl dTTP 10 mM (75 mM)
Guardar a -20°C

Mezclas de terminación:

Para cada uno de los 4 tubos de terminación:
1,1 ml H₂O, 0,12 ml NaCl 5 M (concentración final 5 mM) 10 µl de uno de los cuatro dNTP 10 mM y 1 µl de uno de los ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP o ddTTP) de modo que se prepararon 4 reacciones de terminación distintas, una para cada didesoxinucleótido.

PROGRAMAS

Analisis de secuencias:

-DNASIS HITACHITM: Utilizado para analizar secuencias de DNA. Resultó de gran utilidad para el análisis del uso de codones de cada gen individual, para calcular %GC en el gen total, o para buscar homologías entre genes citocromo *c* de distintas especies.

-PROSIS HITACHITM: Utilizado para analizar secuencias de proteínas. En este trabajo se utilizó para conocer el grado de homología entre citocromos *c* de diversas especies.

Estadísticos:

-"T-test" o test de comparación de medias, SPSS/PCinc. se utilizó para identificar los codones óptimos en los genes de alta expresión de *Kluyveromyces lactis*.

RESULTADOS

CLONACIÓN DEL GEN *KICYC1*

Clonación

El gen *KICYC1* fue clonado por complementación de la línea de *Saccharomyces cerevisiae* AH10, deficiente en citocromos, que adquiría la capacidad de crecer en un medio no fermentable como el glicerol al ser transformada con el citocromo *c* de *Kluyveromyces lactis*.

Para ello esta línea fue transformada con una librería, construida por digestión parcial del DNA genómico de la línea de *K. lactis* NRRL-Y1140 con *Bgl*II e inserción de los fragmentos en el sitio *Bam*HI del vector YEp24 (amablemente cedida por H. Fukuhara). Los transformantes se sembraron en placas CM-Ura y posteriormente se seleccionaron aquellas colonias con capacidad de crecimiento en glicerol. Se procedió después al aislamiento del plásmido de la levadura y al análisis de restricción de los clones obtenidos. La utilización de las enzimas *Cla*I y *Sa*I (sitios únicos en el vector situados a ambos lados del punto de inserción) mostraron la existencia un inserto de 9,8 Kb que fue designado pEC1.

Comprobación de la capacidad de conferir competencia respiratoria y subclonado

Las líneas inicialmente transformadas, una vez curadas del plásmido portador del clon perdieron la capacidad de crecer en glicerol. Adicionalmente, se volvió a transformar con este plásmido, tanto la línea de partida como las levaduras curadas, comprobándose de nuevo la capacidad de crecimiento en glicerol de las mismas a expensas del gen de *K. lactis* clonado. Nuestro siguiente objetivo fue localizar el gen en el fragmento de 9,8 Kb inicial, sirviéndonos de la información obtenida en el patrón de restricción del mismo (figura 9). Para ello procedimos a subclonar fragmentos del inserto primero en YEp24 y posteriormente se continuó subclonando en el vector YEplac112; este vector es muy adecuado por ser portador del gen LacZ de *E. coli* en el sitio de clonaje múltiple, lo que simplifica las labores de selección de recombinantes y porque además resulta útil para la secuenciación.

Los diferentes subclones obtenidos se utilizaron para transformar de nuevo la línea deficiente en citocromo *c* a fin de conocer si los insertos mantenían la capacidad de complementación. Finalmente seleccionamos el plásmido pART10 con un inserto de sólo 1,9 Kb y que mantiene la capacidad de complementación (figura 9).

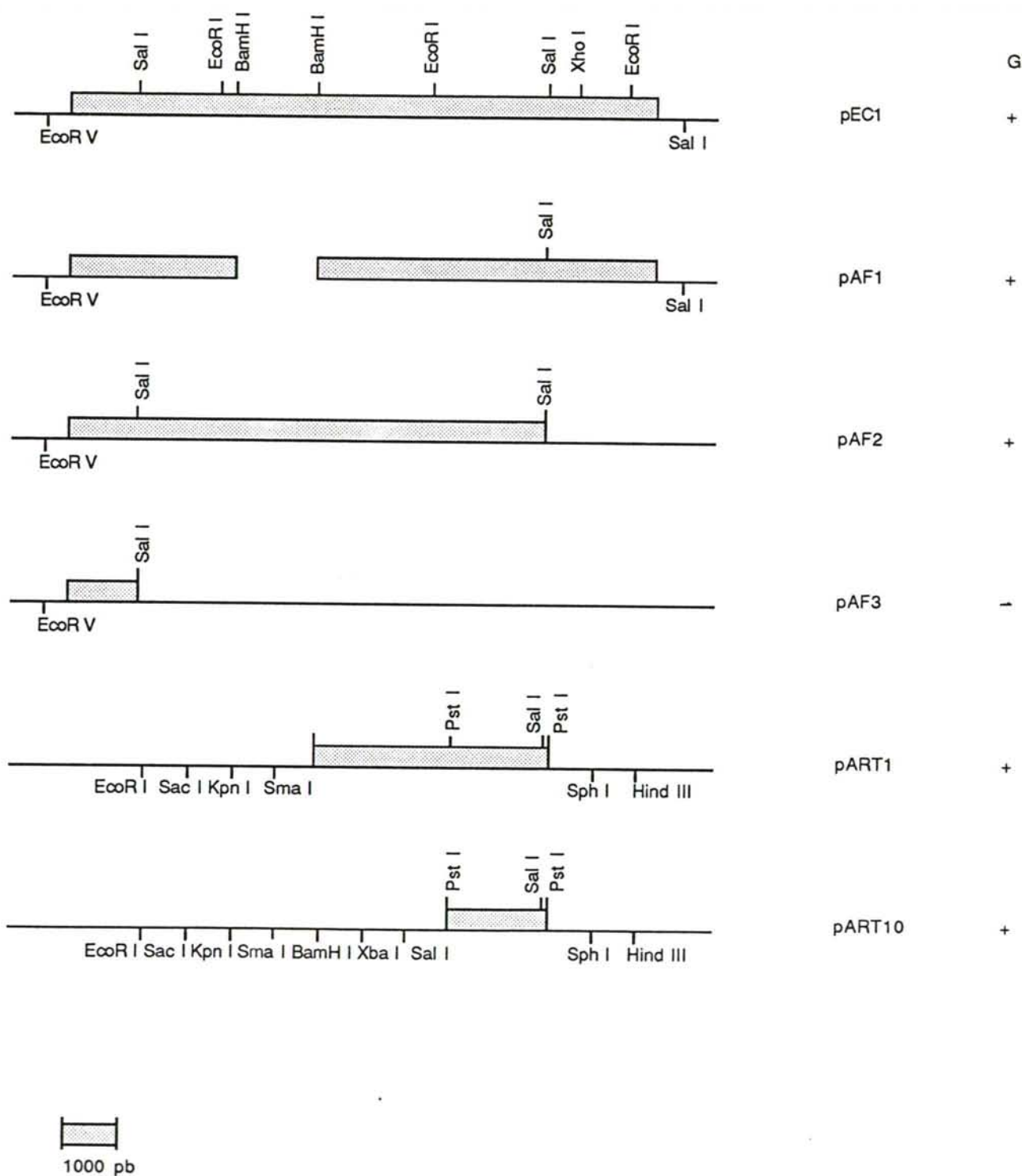


Figura 9. Mapa de restricción del clon inicial pEC1 y construcciones que se efectuaron para el subclonado de *KICYC1*. Las líneas gruesas se corresponden al inserto y las finas a la región circundante del vector. El signo + representa la capacidad de complementación de la mutación CYC-, que se manifiesta fenotípicamente por el crecimiento en glicerol (G).

HOMOLOGÍAS DEL GEN CLONADO CON *CYC1* DE *Saccharomyces cerevisiae*

El término hibridación es utilizado para describir la formación de duplex originados por combinación de fragmentos de ácidos nucleicos monohebra que tienen sus bases complementarias (Britten y Davidson, 1987).

Dada la capacidad del gen clonado de complementar la mutación *cyc1* de *S. cerevisiae*, se realizaron experimentos de Southern blot con objeto de comprobar la existencia de homología secuencia-específica con el gen *CYC1* de *S. cerevisiae*. Como se puede apreciar en la figura 10, la sonda del *CYC1* hibridó con el DNA clonado, lo que reflejaba la existencia de un alto grado de homología entre ambas secuencias de DNA y de nuevo corroboró que el gen clonado codifica para un citocromo *c*.

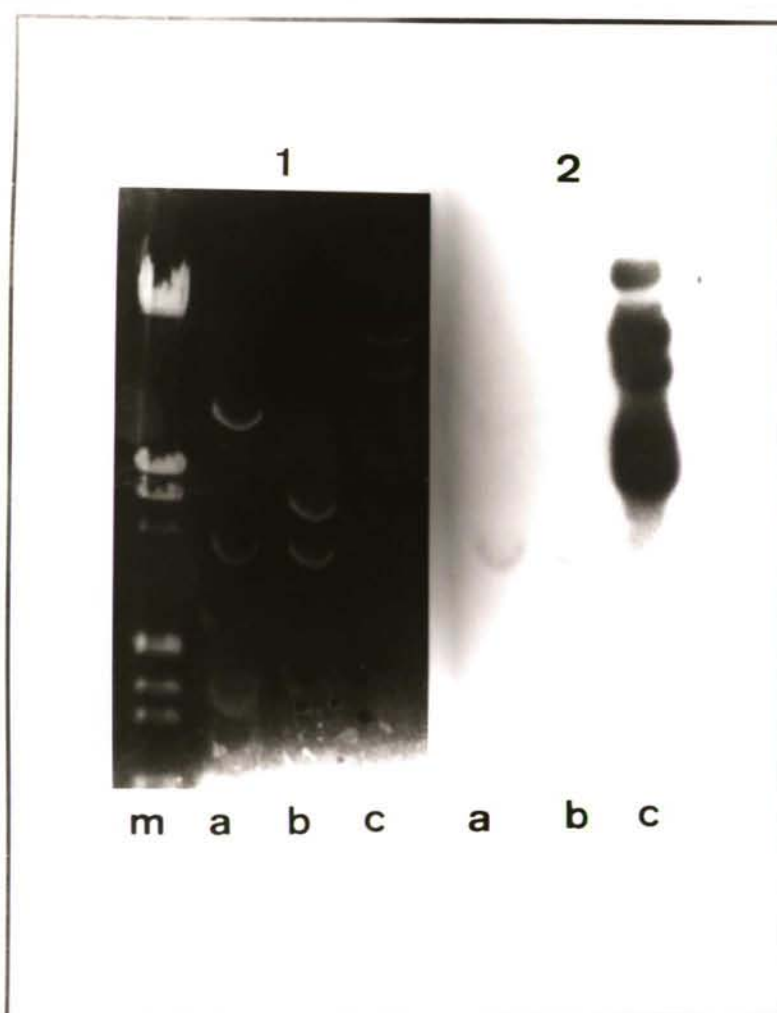


Figura 10. Southern plasmídico. **a** pAF2/*SalI*-*Bam*HI; **b** pART1/*SalI*-*Bam*HI; **c** CYC1-2.4 no cortado. **1**, gel de agarosa, **2** resultado de la autorradiografía. Sonda fragmento *Xho*I-*Hind*III de CYC1-2.4.

ORIGEN GENÓMICO DEL CLON

Una vez demostrada la homología con el gen citocromo *c* de *S. cerevisiae* procedimos a comprobar el origen genómico del clon. Para ello el DNA genómico de *K. lactis* (Y1140) fué sometido a digestiones que generaban fragmentos de tamaño conocido según el mapa de nuestro clon.

Las bandas de hibridación aparecidas en el Southern blot (figura 11b) utilizando como sonda el fragmento *Bam*HI-*Hind*III de pART6 se correspondieron con el tamaño esperado según el mapa de restricción. Este resultado confirma que realmente el DNA clonado pertenece al DNA genómico de *Kluyveromyces lactis*.

Al hibridar DNA genómico de *K. lactis* con una sonda *CYC1* (*Xho*I-*Hind*III de 850pb) (figura 11a) obtuvimos las mismas señales de hibridación que en el caso anterior. De este modo, confirmamos que la sonda *CYC1* hibridaba en el genoma de *K. lactis* con los mismos fragmentos de DNA que la sonda preparada a partir del gen de *K. lactis* clonado por nosotros.

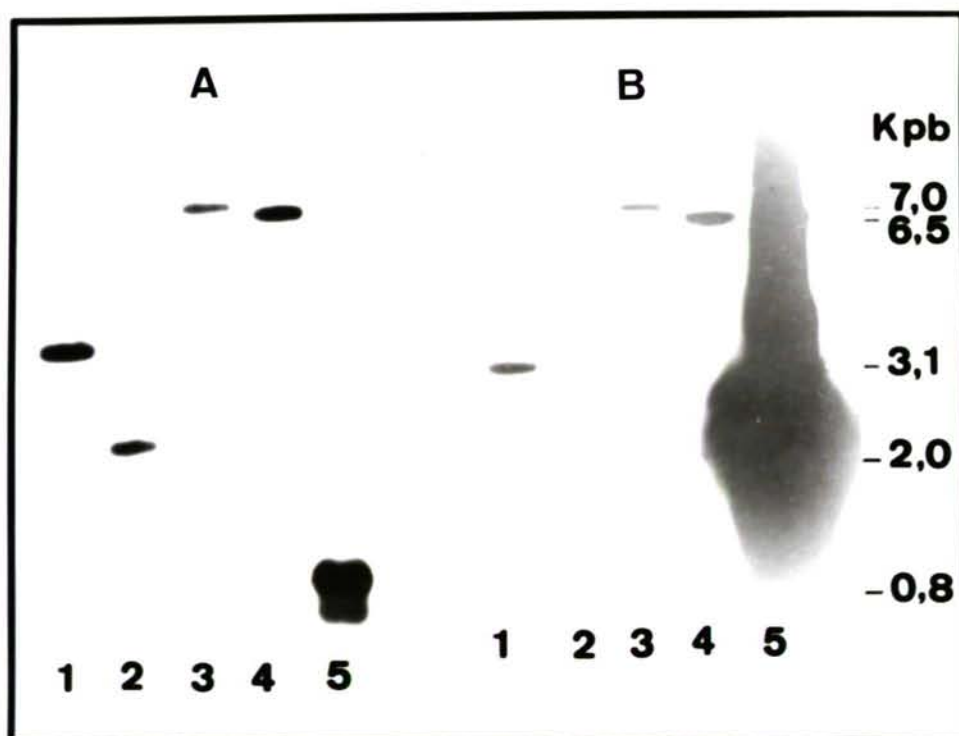


Figura 11. DNA total de Y1140 digerido con 1, *Pst*I-*Eco*RI; 2, *Pst*I-*Sal*I; 3, *Bgl*II; 4, *Bgl*II-*Xho*I; 5, fragmento *Xho*I-*Hind*III de CYC1- 2.4 rescatado. Sondas: A fragmento *Xho*I-*Hind*III de CYC1-2.4. B fragmento *Bam*HI-*Hind*III de pART6

SECUENCIACIÓN DEL GEN *KICYC1*

Siguiendo el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) y empleando la estrategia de secuenciación que se muestra en la figura 12, secuenciamos las dos hebras de un fragmento de DNA de 912 pb del clon que contiene el gen citocromo *c* de *Kluyveromyces lactis*.

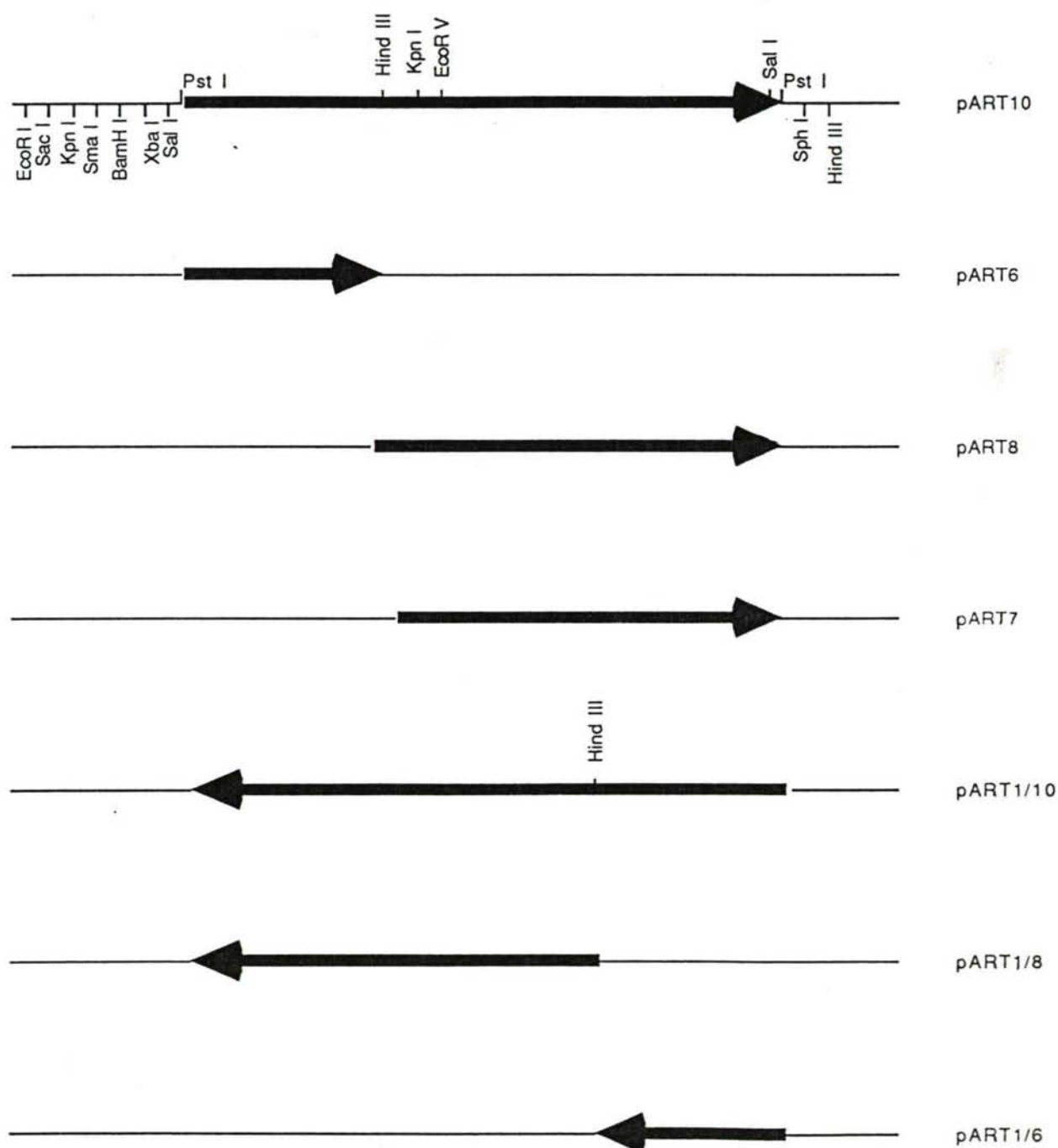


Figura 12. Plásmidos construidos en YEpLac112 para la secuenciación de *KICYC1*, la dirección de la flecha indica la orientación respecto a pART10.

El análisis de la secuencia reveló la existencia de una ORF (pauta abierta de lectura) de 330 pb que codifica para una proteína de gran homología con otras proteínas citocromo *c*. En la figura 13, se presenta el tramo secuenciado incluyendo la traducción a la secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína.

										C	AAAACGCACA	ACGGGAAACC			
-350	AATGAGAAAA	AAGTCTCAGA	GGCTTCACAG	AATTTGGCTC	ATCTCGTGTC										
-300	TTGACCGATG	TTCCCGAAAT	GATAGACTTG	TTTCGAAGCA	TTTTTTCGGT										
-250	TTAAGTAGTT	AAAAACAGGT	AGGAGAAAAA	TTTATAGTATG	CGCACTATGG										
-200	TTTGTTGATA	ATTTCATATA	TAACATAACAT	ATTAAGATTT	GATATTCGAT										
-150	TGAATTTGAT	GTTTCTTTAG	CAAGTCTTTT	TAGCGTTTTT	TTTTTCTCTCC										
-100	TTTCTATCTT	AATTAAAGTT	TCCCAAACATA	TCAGTATTAA	GGATTGATTC										
- 50	GTCAAATCAA	ATAACTGTTA	CACAACCAAC	ACAACATAATA	TAAAGTCATA										
	ATG	CCA	GCT	CCA	TAC	AAG	AAG	GGT	TCC	GAA	AAG	AAG	GGT	GCT	ACT
	Met	Pro	Ala	Pro	Tyr	Lys	Lys	Gly	Ser	Glu	Lys	Lys	Gly	Ala	Thr
	TTG	TTC	AAG	ACC	AGA	TGT	TTG	CAA	TGT	CAC	ACC	GTT	GAA	GCC	GGT
	Leu	Phe	Lys	Thr	Arg	Cys	Leu	Gln	Cys	His	Thr	Val	Glu	Ala	Gly
	GGT	CCA	CAC	AAG	GTC	GGT	CCA	AAT	TTG	CAT	GGT	GTC	TTC	GGT	AGA
	Gly	Pro	His	Lys	Val	Gly	Pro	Asn	Leu	His	Gly	Val	Phe	Gly	Arg
	CAC	TCT	GGT	AAA	GCT	TCC	GGT	TAC	TCT	TAC	ACT	GAC	GCT	AAC	ATC
	His	Ser	Gly	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Asp	Ala	Asn	Ile
	AAG	AAG	AAC	GTC	TTG	TGG	GAT	GAA	CAA	ACT	ATG	TCT	GAC	TAC	TTG
	Lys	Lys	Asn	Val	Leu	Trp	Asp	Glu	Gln	Thr	Met	Ser	Asp	Tyr	Leu
	GAA	AAC	CCA	AAG	AAG	TAC	ATT	CCA	GGT	ACC	AAG	ATG	GCT	TTC	GGT
	Glu	Asn	Pro	Lys	Lys	Tyr	Ile	Pro	Gly	Thr	Lys	Met	Ala	Phe	Gly
	GGT	TTG	AAG	AAG	GAA	AAG	GAC	AGA	AAC	GAT	ATC	GTT	ACT	TAC	ATG
	Gly	Leu	Lys	Lys	Glu	Lys	Asp	Arg	Asn	Asp	Ile	Val	Thr	Tyr	Met
	TTG	AAG	GCT	TGT	AAA	TAA	ACATTTATGA	GTAAATGAA	CTTTCCCAAT						
	Leu	Lys	Ala	Cys	Lys	+++									
	TTGTTTTGTT	TCCTATAAAT	GTCTTCCTTT	AACCTCCATG	CTTCTCTCAT										
	TTGAAAAGAA	AAAATTCATT	CATGCACGCA	TGGTAGATTG	ATATTATGTA										
	TATACACCAT	CTCACCTTC	CCGGAACGCT	TTTATTTTGC	ACCTTCACCT										
	TTTCTCTCTG	CATAGAGAAA	ATTCCTTA												

Figura 13. Secuencia del gen *K1CYC1*

Principales características de la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida a partir de la secuencia del gen.

El pequeño tamaño de la proteína citocromo *c*, así como su grado de conservación entre especies, llevó a muchos autores a la realización de estudios comparativos y filogenéticos. Estos estudios se iniciaron a partir de su secuencia aminoacídica y posteriormente, con el desarrollo de los métodos de secuenciación del DNA, a partir de las secuencias nucleotídicas de los genes.

Los aminoácidos que están altamente conservados en todas las proteínas citocromo *c* son aquellos importantes para su función (Hampsey *et al.*, 1986 y 1988) y, como veremos a continuación, también están presentes en el citocromo *c* de *K. lactis*. Las cisteínas en posiciones 21 y 24, histidina 25, y metionina 87 están relacionadas con la unión a hemo; las leucinas 39 y 75, el triptófano 66 y la tirosina 74 se encuentran implicados en la formación del bolsillo hidrofóbico alrededor de hemo. Otros residuos que también son importantes para la formación del bolsillo hidrofóbico se encuentran sustituidos en *K. lactis* por aminoácidos equivalentes; este es el caso de la isoleucina 101 y la metionina 105 que se encuentran en las posiciones correspondientes a leucina. También están conservadas las glicinas en posición 13 y 36, así como la prolina en posición 78, estos aminoácidos están relacionados con el plegamiento de la proteína.

Homologías con otras especies a nivel de la secuencia del gen y de la proteína:

Utilizando los programas DNASIS y PROSIS (HITACHI) realizamos un estudio comparativo de homologías entre genes y también entre proteínas citocromo *c* de levaduras y de otras especies menos relacionadas. En la figura 14, se muestran, los *Dot-Plots*, diagramas de homología (Collins y Coulson, 1987), obtenidos empleando el programa PROSIS, al comparar los 110 aminoácidos de *KICYC1* con la secuencia aminoacídica de proteínas citocromo *c* de otras especies.

En la tabla II, se muestran los valores de homología que obtuvimos al comparar secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de citocromos de levaduras y *Neurospora crassa* con *KICYC1*.

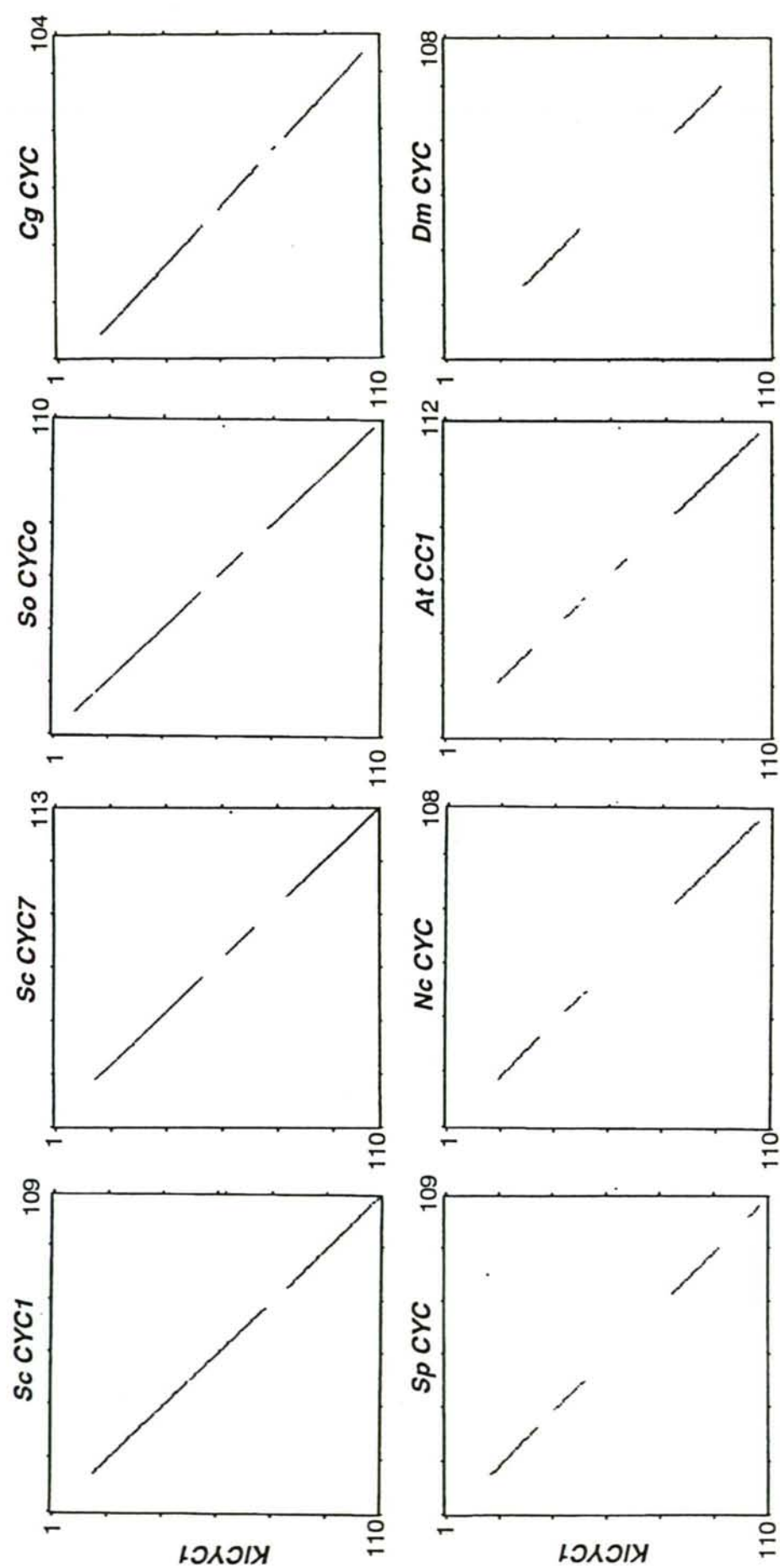


Figura 14. Dot-Plots de homología entre la secuencia de aminoácidos del citocromo *c* de *K. lactis* (*KICYC1*) y los correspondientes de *S. cerevisiae* *CYC1* (Smith *et al.*, 1979), *CYC7* (Montgomery *et al.*, 1980), *CYCo* *Schwanniomyces occidentalis* (Amegadzie *et al.*, 1990), *CgCYC* *Candida glabrata* (Clark-Walker, 1991), *spCYC* *Schizosaccharomyces pombe* (Russell y Hall, 1982), *NcCYC* *Neurospora crassa* (número de acceso al EMBL X05506) y especies evolutivamente más alejadas como la planta *Arabidopsis thaliana*, *AtCC1* (Kemmerer *et al.*, 1991), o el insecto *Drosophyla melanogaster*, *DmCYC* (Swanson *et al.*, 1985).

Tabla II. Valores numéricos del porcentaje de homología entre citocromos. N nucleótidos, A aminoácidos deducidos a partir de la secuencia de nucleótidos. *S. occidentalis*: *Schwanniomyces occidentalis*; *C. glabrata*: *Candida glabrata*; *S. pombe*: *Schizosaccharomyces pombe*.

	N	A
<i>S. cerevisiae</i> CYC1	77	86
<i>S. occidentalis</i> CYCo	80,7	86
<i>S. cerevisiae</i> CYC7	74	77
<i>C. glabrata</i> CYC	73,7	80
<i>S. pombe</i> CYC	66	71
<i>N. crassa</i> CYC	67,9	70

Los genes *CYC1* y *CYCo* son los que muestran mayor grado de homología con el gen *KICYC1* seguidos de los correspondientes de *C. glabrata* y el *CYC7* de *S. cerevisiae*. El gen de *S. pombe* tiene un menor grado de homología, próxima incluso a la encontrada para especies alejadas filogenéticamente de las levaduras.

ESTUDIO DEL USO DE CODONES EN *Kluyveromyces lactis*.

El uso de codones de un gen está relacionado con sus niveles de expresión (Bennetzen y Hall, 1982b), la disponibilidad de la secuencia del gen *KICYC1* nos llevó a estudiar su uso de códon con el objeto inicial de compararlo con el de los genes *CYC1* y *CYC7* de *S. cerevisiae*, previamente estudiado por Ikemura (1985). Al profundizar en el tema y con objeto de conocer si las diferencias encontradas eran debidas sólo a la secuencia del gen o a diferencias mas generales entre las dos especies, decidimos estudiar el uso de codones en *Kluyveromyces lactis*.

1-El gen *KICYC1* utiliza un número limitado de codones.

Para estudiar el uso de codones en el gen *KICYC1* calculamos su CBI (Codon Bias Index) índice creado por Bennetzen y Hall (1982b) que indica en qué medida un determinado gen utiliza los codones que resultan óptimos en la especie. Estos codones óptimos son los más usados en los genes de alta expresión. A partir de ahora utilizaremos el término *bias* para referirnos al uso preferente en un gen de los codones óptimos para su especie.

Para ello y al igual que previamente lo hicieron otros autores (Saliola *et al.*, 1991; Stark y Milner 1989; Goffrini *et al.*, 1991), tomamos como óptimos aquellos codones que lo son en *S. cerevisiae* basándonos para esta asignación en la revisión de Sharp y Cowe (1991). Siguiendo este criterio, el CBI calculado para *KICYC1* toma un valor de 0,8; esto indica que el gen que codifica para el citocromo *c* de *K. lactis* tiene preferencia por los codones óptimos para los genes de alta expresión de *S. cerevisiae*.

Estudios previos de Ikemura (1985) y Sharp y Cowe (1991) indican que los genes citocromo *c* de *S. cerevisiae*, *CYC1* y *CYC7*, son de moderado (CBI 0,47) y bajo (CBI 0,16) *bias* respectivamente. Por tanto parece existir una diferencia grande en el uso de codones entre los genes de ambas levaduras.

Llegados a este punto consideramos importante aclarar si este mayor *bias* podía ser consecuencia de una asignación incorrecta, al utilizar como referencia aquellos codones óptimos de *S. cerevisiae*, sin comprobar previamente si esos mismos aparecen como óptimos en *K. lactis*.

Uso de Codones en *Kluyveromyces lactis*

En una reciente recopilación del uso de codones Wada y colaboradores (1992) presentaron el uso de codones general para los genes de *K. lactis* que estaban depositados en la base de datos Genbank, pero incluyeron todos los datos de secuencias disponibles juntos, sin hacer distinciones entre genes de alta y baja expresión.

Abordamos el análisis del uso de codones en las secuencias de 25 genes de *K. lactis* obtenidas a través de las bases de datos EMBL y GenBank o bien directamente de

referencias bibliográficas. Para nuestro estudio, eliminamos de las secuencias los intrones y codones de terminación. La composición de bases y los valores del uso de codones fueron obtenidos a partir de las secuencias con el programa DNASIS de HITACHI.

Para seleccionar los genes que íbamos a incluir en los grupos de alto y bajo *bias* nos guiamos del criterio de Lloyd y Sharp (1992); estos autores agruparon los genes en función de su valor *Nc*, Número efectivo de codones (Wright, 1990). Según este índice, un gen que utilice sólo un único triplete por aminoácido tiene el máximo *bias* y el mínimo valor del índice, 20; por el contrario un gen que utilice todos los codones por igual tiene un valor de 61.

Tras calcular el *Nc* de los 25 genes (Tabla III) seleccionamos los 8 genes con menor *Nc*, (valores comprendidos entre 23,65 y 27,9) como representantes del grupo de alto *bias* y los 8 con mayor valor para este índice (valores entre 43,62 y 54,28) como representantes del grupo de bajo *bias*.

En la tabla IV se muestran los valores de RSCU (*Relative Synonymous Codon Usage*) que calculamos para cada grupo. Este índice representa la frecuencia relativa para el uso de un codón dentro de un grupo de codones sinónimos (Sharp *et al.*, 1986).

La comparación de los valores de RSCU entre los grupos de alto y bajo *bias* fué el sistema empleado para la asignación de los codones óptimos, estrategia previamente aplicada a otras especies de levaduras (Lloyd y Sharp, 1992). Aplicando el test T de student, T-test programa SPSS/PC, encontramos 21 codones que resultaron ser más frecuentes en el grupo de alto *bias* con un nivel de significación ($p < 0,04$). Siguiendo este criterio, fueron identificados los codones óptimos para los 18 aminoácidos codificados por mas de un triplete (tabla IV). Los aminoácidos serina, treonina y alanina son los únicos con dos codones óptimos. Si se seleccionaba $p < 0,01$ los codones UGU (cisteína), ACU y ACC (treonina) no serían significativamente óptimos. Sin embargo, los consideramos también como óptimos por su mayor proximidad estadística a este último grupo que al de los "no-óptimos".

Al analizar los codones óptimos y compararlos con los de *S. cerevisiae* o *Candida glabrata* encontramos que los codones AUU (isoleucina) y GUU (valina), que son óptimos en las citadas especies no lo son en *K. lactis*. Por otro lado, el triplete GCC (alanina) que es óptimo en *K. lactis* no lo es en *S. cerevisiae* ni en *Candida glabrata*.

Tabla III. Referencias bibliográficas e índices para los genes de *K. lactis* analizados en este trabajo

GEN	L ^a	Producto génico	Nc ^b	CBI ^b	ICDI ^b	Referencia
<i>ACT</i>	375	Actina	26,97	0,76	0,64	Deshler <i>et al.</i> , 1989
<i>ADH1</i>	350	Alcohol deshidrogenasa 1	25,95	0,76	0,68	Saliola <i>et al.</i> , 1990
<i>ADH2</i>	348	Alcohol deshidrogenasa 2	31,29	0,58	0,45	Shain <i>et al.</i> , 1992
<i>ADH3</i>	374	Alcohol deshidrogenasa 3	27,90	0,72	0,56	Saliola <i>et al.</i> , 1991
<i>ADH4</i>	375	Alcohol deshidrogenasa 4	30,67	0,75	0,58	Saliola <i>et al.</i> , 1991
<i>GAL7</i>	370	Epimerasa	42,86	0,24	0,20	Webster y Dickson, 1988
<i>GAL10</i>	687	Transferasa	43,62	0,29	0,17	Webster y Dickson, 1988
<i>HHT1</i>	136	Histona H3	28,98	0,81	0,65	Stark y Milner, 1989
<i>IPP</i>	287	Pirofosfatasa inorgánica	29,51	0,65	0,52	Stark y Milner, 1989
<i>KICYC1</i>	110	Citocromo <i>c</i>	26,94	0,85	0,68	Freire <i>et al.</i> , 1993
<i>KLERD2</i>	219	Proteína receptor RE	43,65	0,13	0,37	Lewis <i>et al.</i> , 1990
<i>KIGAL11</i>	1007*	Activador transcripcional	45,87	0,13	0,18	Dickson <i>et al.</i> , 1991
<i>KIGAP1</i>	329	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	27,72	0,64	0,56	Shuster, 1990
<i>KIL25</i>	142	Proteína ribosómica L25	23,65	0,82	0,67	Bergkamp-Steffens <i>et al.</i> , 1992
<i>KIKEX1</i>	700	Serin proteinasa	52,90	0,01	0,09	Tanguy-Rougeau <i>et al.</i> , 1988
<i>KIPGK</i>	416	3-Fosfoglicerato quinasa	27,70	0,73	0,59	Fournier <i>et al.</i> , 1989
<i>KIRP59</i>	137	Proteína ribosómica 59	24,05	0,77	0,79	Larson y Rossi, 1991
<i>LAC4</i>	1025	β -galactosidasa	47,18	0,16	0,09	Poch <i>et al.</i> , 1992
<i>LAC9</i>	865	Activador transcripcional	54,28	0,03	0,06	Salmeron y Johnston, 1986
<i>LEU2</i>	364	β -isopropilmalato deshidrogenasa	34,05	0,49	0,37	Zang <i>et al.</i> , 1992
<i>RAG1</i>	567	Transportador de azúcar	34,86	0,40	0,42	Goffrini <i>et al.</i> , 1992
<i>RAG2</i>	556	Glucosa fosfato isomerasa	33,70	0,57	0,32	Wésolowski-Louvel <i>et al.</i> , 1988
<i>SEC14</i>	301	Proteína secretora	43,90	0,33	0,22	Salama <i>et al.</i> , 1990
<i>TRP1</i>	210	Fosforribosil antranilato isomerasa	36,44	0,12	0,22	Stark y Milner, 1989
<i>URA3</i>	267	Orotidina-5'-fosfato descarboxilasa	49,75	0,20	0,13	Shuster <i>et al.</i> , 1987

^aL longitud del gen en codones, (* secuencia incompleta). ^bNc Número efectivo de codones (Wright, 1990), CBI Codon Bias Index (Bennetzen y Hall, 1982b), ICDI Índice de desviación intrínseca de Codones (este trabajo).

Tabla IV. Uso de codones en genes de alto y bajo *bias* de *K. lactis*

		N _H	RSCU _H	N _B	RSCU _B			N _H	RSCU _H	N _B	RSCU _B
Phe	UUU	9	0,24	97	0,94	Ala	GCU*	150	2,80	129	1,72
	UUC*	65	1,76	110	1,06		GCC*	57	1,06	47	0,62
Leu	UUA	7	0,26	93	1,24		GCA	6	0,11	88	1,17
	UUG*	131	4,82	165	2,20		GCG	1	0,03	37	0,49
	CUU	2	0,07	63	0,84	Tyr	UAU	3	0,08	104	1,01
	CUC	0	0,00	29	0,38		UAC°	67	1,92	101	0,99
Ile	CUA	22	0,81	74	0,99	His	CAU	9	0,42	65	1,20
	CUG	1	0,04	26	0,35		CAC*	34	1,58	43	0,80
	AUU	40	0,94	122	1,28	Gln	CAA*	55	2,00	193	1,19
	AUC*	87	2,06	107	1,12		CAG	0	0,00	131	0,81
Met	AUA	0	0,00	57	0,60	Asn	AAU	8	0,18	163	1,07
	AUG	43	1,00	105	1,00		AAC*	82	1,82	141	0,93
Val	GUU	109	1,98	133	1,78	Lys	AAA	20	0,22	164	0,95
	GUC*	99	1,80	64	0,86		AAG*	168	1,78	181	1,05
	GUA	3	0,05	54	0,72	Asp	GAU	51	0,84	197	1,40
	GUG	9	0,17	47	0,64		GAC*	71	1,16	85	0,60
Ser	UCU*	74	3,02	126	1,84	Glu	GAA*	122	2,00	215	1,45
	UCC*	61	2,49	61	0,89		GAG	0	0,00	82	0,55
	UCA	5	0,20	95	1,39	Cys	UGU°	24	2,00	35	1,27
	UCG	0	0,00	39	0,57		UGC	0	0,00	20	0,73
Trp	AGU	4	0,16	55	0,80	Arg	CGU	6	0,44	30	0,96
	AGC	3	0,13	35	0,51		CGC	0	0,00	6	0,19
	UGG	20	1,00	73	1,00		CGA	0	0,00	9	0,29
							CGG	0	0,00	9	0,29
Pro	CCU	8	0,34	89	1,38		AGA*	76	5,56	91	2,90
	CCC	0	0,00	21	0,33		AGG	0	0,00	43	1,37
	CCA*	86	3,66	119	1,85	Gly	GGU*	198	3,86	153	2,14
	CCG	0	0,00	28	0,44		GGC	4	0,08	41	0,57
Thr	ACU°	63	2,00	115	1,56		GGA	0	0,00	69	0,97
	ACC°	61	1,94	63	0,86		GGG	3	0,06	22	0,32
	ACA	1	0,03	83	1,13						
	ACG	1	0,03	33	0,45						

^aN, número de codones; RSCU, Uso Relativo de Codones Sinónimos (Bennetzen y Hall, 1982b); (H) genes de alto *bias* (B) genes de bajo *bias*. *Codones óptimos con $p < 0,01$; ° codones óptimos con $p < 0,04$. Los genes seleccionados para recalcular el RSCU son: *ADH1*, *ADH3*, *ACT*, *KICYC1*, *KIGAP1*, *KIL25*, *KIPGK*, *KIRP59* (alto *bias*) y *GAL10*, *GAL11*, *KIKEX1*, *KIERD2*, *LAC4*, *LAC9*, *SEC14*, *URA3* (bajo *bias*).

Con los nuevos datos del uso de codones en *K. lactis* calculamos el CBI para los 25 genes disponibles de la especie. Los valores obtenidos con la nueva asignación de los codones óptimos son ligeramente menores que los que previamente habían dado otros autores empleando los codones óptimos de *S. cerevisiae* (Saliola, 1991, Stark y Milner, 1989; Goffrini *et al.*, 1991).

Cabe señalar que es precisamente el gen *KICYC1* el que presenta mayor valor para este índice. Lo que concuerda con nuestro primer análisis que revelaba un mayor *bias* en el uso de codones en *KICYC1* que en *CYC1* y al mismo tiempo confirma que pese a la homología existente en términos de proteína y secuencia de DNA, *CYC1* y *KICYC1* difieren notablemente en el uso de codones.

Importancia de la tercera base y %GC en 3ª posición.

La naturaleza del nucleótido situado en tercera posición del triplete, ha sido objeto de diferentes estudios (Ticher y Graur, 1989; Sharp y Cowe, 1991). En los genes de bajo *bias* de *Saccharomyces cerevisiae* predominan los codones con A o T en tercera posición, reflejando la tendencia mutacional en la especie, mientras que en los de alto *bias* suele existir preferencia por C o G en tercera posición Sharp y Cowe (1991).

La comparación de los valores de RSCU de los genes de bajo *bias* de *K. lactis* obtenidos en este estudio con los de *S. cerevisiae* (Sharp y Cowe, 1991) revela un mayor grado de diferencia entre ambas y generalmente, los codones más abundantes son aquellos acabados en A o T, lo que es indicativo de una preferencia mutacional mayor en *K. lactis* para estos nucleótidos.

Con objeto de conocer si en *K. lactis* existe correlación entre la preferencia en el uso de codones y la composición de la tercera base analizamos la composición en la tercera base para los genes de alta y baja expresión (Tabla V). Los datos muestran que en ambos grupos de genes la T se utiliza frecuentemente, mientras que la G es claramente evitada. La aparición de C en tercera posición es mas frecuente en los grupos con alto *bias* mientras que la A predomina en aquellos que hacen un uso mas aleatorio de los mismos.

Encontramos que existe una correlación positiva entre los valores de CBI de los genes estudiados y el contenido de C en tercera posición $r = +0,803$, mientras que la correlación entre el contenido de A en tercera posición y el CBI es negativa $r = -0,697$.

Tabla V. Porcentajes de preferencia en la tercera posición del codón en los 25 genes de *K. lactis*.

	U	C	A	G	C+G	WC+G
<i>KICYC1</i>	<u>31,6</u>	<u>27,0</u>	7,1	24,3	51,3	44,1
<i>KIL25</i>	<u>30,0</u>	<u>30,0</u>	17,0	23,0	53,0	43,8
<i>HHT1</i>	<u>26,3</u>	23,4	<u>32,8</u>	17,5	40,9	43,3
<i>KIRP59</i>	<u>41,0</u>	<u>24,0</u>	21,0	14,0	38,0	47,6
<i>KIACT</i>	<u>31,1</u>	<u>32,0</u>	21,8	15,1	47,1	44,8
<i>KIADH1</i>	<u>29,3</u>	<u>36,5</u>	19,4	14,8	51,3	48,5
<i>KIADH4</i>	<u>33,2</u>	<u>32,2</u>	18,9	15,7	47,9	47,1
<i>KIPGK</i>	<u>31,9</u>	<u>31,2</u>	18,0	18,9	50,1	45,9
<i>KIADH3</i>	<u>35,2</u>	<u>30,4</u>	17,9	16,5	46,9	47,2
<i>IPP</i>	<u>32,3</u>	<u>28,1</u>	19,8	19,8	47,9	43,6
<i>KIGAP1</i>	<u>42,4</u>	<u>27,9</u>	14,2	15,5	43,4	44,5
<hr/>						
<i>ADH2</i>	<u>38,0</u>	<u>28,0</u>	20,0	14,0	42,0	45,3
<i>RAG2</i>	<u>34,2</u>	<u>27,0</u>	20,2	18,6	45,6	41,9
<i>LEU2</i>	<u>38,4</u>	20,8	<u>25,7</u>	15,1	35,9	43,8
<i>RAG1</i>	<u>41,5</u>	<u>22,5</u>	21,0	15,0	37,5	40,4
<i>SEC14</i>	<u>28,5</u>	22,2	<u>29,8</u>	19,5	41,7	41,5
<hr/>						
<i>GAL10</i>	<u>37,5</u>	<u>23,7</u>	23,1	15,7	39,4	41,5
<i>GAL7</i>	<u>29,6</u>	21,6	<u>31,0</u>	17,8	39,4	41,4
<i>URA3</i>	<u>34,3</u>	20,2	<u>27,2</u>	18,3	38,5	43,3
<i>LAC4</i>	<u>37,2</u>	21,6	21,1	20,1	41,7	41,7
<i>GAL11</i>	<u>29,3</u>	12,4	<u>32,0</u>	26,3	38,7	41,5
<i>KIERD2</i>	<u>30,0</u>	23,2	<u>30,9</u>	15,9	39,1	33,8
<i>TRP1</i>	<u>38,0</u>	17,5	<u>26,0</u>	18,5	36,0	41,1
<i>LAC9</i>	<u>28,9</u>	19,3	<u>30,8</u>	21,0	40,3	41,5
<i>KLKEX1</i>	<u>35,0</u>	18,0	<u>31,0</u>	16,0	34,0	40,5

ICDI Índice de Desviación Intrínseca de Codones; **CBI** *Codon Bias Index* (Bennetzen y Hall, 1982b); **C+G** contenido total C+G en la tercera posición del gen; **WC+G** porcentaje C+G en toda la ORF.

Las diferencias entre los dos grupos también se reflejan en el contenido en C+G. El contenido C+G es mayor en el grupo de los genes de alto *bias* (CBI entre 0,85 y 0,58) cuyo valor medio es 47,0 que en el grupo de bajo *bias* (CBI entre 0,29 y 0,01) con un valor medio de 38,9. Los genes con valores de CBI intermedio toman también valores C+G intermedios (40,2), sin embargo, este valor es más próximo al de los genes de bajo *bias*.

Si comparamos el contenido C+G en la tercera posición con el contenido total C+G de la región codificadora del gen (WC+G) se aprecia que en los genes de alto *bias* el valor medio C+G en las posiciones sinónimas es ligeramente superior al valor medio para WC+G (45,5); en los genes con un valor de CBI menor de 0,29 el valor medio WC+G es mayor que el contenido C+G en tercera posición. La existencia de una correlación positiva no implica una relación causa efecto, pero este estudio muestra un cambio selectivo de A a C en la tercera posición del codón en los genes de alto *bias*.

Comparación del uso de codones de *KlCYC1* con el de otros genes citocromo *c* de levaduras

-Existen diferencias en el uso de codones entre genes de K. lactis y S. cerevisiae relacionados con funciones mitocondriales o respiratorias.

Además de las diferencias señaladas para los genes citocromo *c*, se han encontrado casos similares para genes relacionados con funciones mitocondriales como los genes *KIADH3* y *KIADH4*, que presentan un CBI mayor que sus genes homólogos en *S. cerevisiae* (Saliola *et al.*, 1991). Otros genes de *S. cerevisiae* relacionados con funciones mitocondriales o respiratorias poseen valores de CBI por debajo de 0,5; este es el caso de *COR1*, gen de la citocromo reductasa y los genes que codifican para diferentes subunidades de la citocromo oxidasa o el citocromo *cI* (Sharp y Cowe, 1991).

Estos datos, junto con la correlación alto *bias*-alta expresión, nos llevaron a plantearnos si tal vez los genes relacionados con funciones mitocondriales o respiratorias fuesen más altamente expresados en *K. lactis* que sus homólogos en *S. cerevisiae*, debido a las diferencias fisiológicas existentes entre ambas levaduras.

En una primera aproximación calculamos el RSCU para los genes citocromo *c* de cinco especies de levaduras. En la tabla VI, puede observarse una mayor similitud en el RSCU entre *K. lactis* y *S. occidentalis* o *C. glabrata*. En los genes de *S. cerevisiae* se aprecia un uso mas aleatorio de codones.

Tabla VI. RSCU para genes citocromo *c* de levaduras.

	Kl	Sc1	Sc7	So	Cg	Sp		Kl	Sc1	Sc7	So	Cg	Sp
UUU-Phe	0,00	1,00	1,50	1,33	0,00	0,67	GCU-Ala	3,40	1,70	1,50	2,50	1,70	1,80
UUC-Phe	2,00	1,00	0,50	0,67	2,00	1,33	GCC-Ala	0,60	2,30	1,00	1,50	2,30	2,20
							GCA-Ala	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
UUA-Leu	0,00	0,75	2,40	4,28	0,85	0,00	GCG-Ala	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00
UUG-Leu	6,00	3,75	3,60	1,71	2,57	2,40							
							UAU-Tyr	0,00	0,80	1,20	0,00	0,00	0,80
CUU-Leu	0,00	0,75	0,00	0,00	0,00	1,20	UAC-Tyr	2,00	1,20	0,80	2,00	2,00	1,20
CUC-Leu	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,20							
CUA-Leu	0,00	0,75	0,00	0,00	2,57	0,00	CAU-His	0,50	1,00	2,00	0,00	0,00	1,00
CUG-Leu	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,20	CAC-His	1,50	1,00	0,00	2,00	2,00	1,00
AUU-Ile	1,00	1,50	1,80	2,00	0,00	2,00	CAA-Gln	2,00	2,00	0,00	2,00	2,00	2,00
AUC-Ile	2,00	1,50	0,60	1,00	3,00	1,00	CAG-Gln	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00
AUA-Ile	0,00	0,00	0,60	0,00	0,00	0,00							
							AAU-Asn	0,40	0,57	0,30	0,33	0,00	0,60
AUG-Met	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	AAC-Asn	1,60	1,43	1,70	1,77	2,00	1,40
GUU-Val	1,60	1,33	1,33	1,33	2,66	1,00	AAA-Lys	0,23	0,75	0,95	1,05	0,23	1,70
GUC-Val	2,40	0,00	1,33	2,66	1,33	2,00	AAG-Lys	1,77	1,25	1,05	0,95	1,76	0,30
GUA-Val	0,00	0,00	1,33	0,00	0,00	1,00							
GUG-Val	0,00	2,67	0,00	0,00	0,00	0,00	GAU-Asp	0,80	0,50	1,60	0,80	0,86	1,50
							GAC-Asp	1,20	1,50	0,40	1,20	1,14	0,50
UCU-Ser	3,60	3,00	2,00	1,50	0,00	4,00							
UCC-Ser	2,40	0,00	1,00	0,00	3,60	2,00	GAA-Glu	2,00	1,43	1,00	2,00	1,00	1,50
UCA-Ser	0,00	1,50	1,00	4,50	1,20	0,00	GAG-Glu	0,00	0,57	1,00	0,00	1,00	0,50
UCG-Ser	0,00	1,50	0,00	0,00	0,00	0,00							
							UGU-Cys	2,00	1,33	2,00	2,00	1,00	1,00
AGU-Ser	0,00	0,00	2,00	0,00	1,20	0,00	UGC-Cys	0,00	0,66	0,00	0,00	1,00	1,00
AGC-Ser	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00							
							CGU-Arg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,50
UGG-Trp	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	CGC-Arg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50
							CGA-Arg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CCU-Pro	0,00	1,00	2,40	0,00	1,00	1,30	CGG-Arg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CCC-Pro	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00							
CCA-Pro	4,00	3,00	1,60	4,00	3,00	0,00	AGA-Arg	6,00	6,00	4,00	6,00	6,00	0,00
CCG-Pro	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,70	AGG-Arg	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00
ACU-Thr	2,30	1,50	0,44	2,50	2,00	1,80	GGU-Gly	4,00	2,67	2,60	3,70	2,90	2,30
ACC-Thr	1,70	1,50	0,44	1,50	2,00	1,80	GGC-Gly	0,00	0,67	0,33	0,00	1,10	1,33
ACA-Thr	0,00	1,00	1,33	0,00	0,00	0,00	GGA-Gly	0,00	0,00	0,67	0,30	0,00	0,33
ACG-Thr	0,00	0,00	1,80	0,00	0,00	0,44	GGG-Gly	0,00	0,67	0,33	0,00	0,00	0,00

Kl *K. lactis*; Sc *S. cerevisiae*; So *S. occidentalis*; Cg *C. glabrata*; Sp *S. pombe*

Como vimos en la introducción del presente trabajo, la levadura *K. lactis* está clasificada como respiradora aerobia (Gancedo y Serrano, 1989), mientras que *S. cerevisiae* es una levadura fermentadora que muestra un efecto Crabtree positivo, definido como una aparente represión de la respiración por la fermentación (Alexander y Jeffries, 1990). Ello nos llevó a postular que posiblemente la capacidad respiratoria de *K. lactis* se encuentre relacionada con un alto nivel de expresión de su citocromo *c* y con un mayor *bias* en el uso de codones del gen *K1CYC1*. Por ello decidimos estudiar el uso de codones en otros genes citocromo *c* de levaduras previamente clonados.

Necesidad de un nuevo índice para el estudio del uso de codones en los genes citocromo c.

Los codones óptimos de las especies *C. glabrata* o *S. occidentalis* no habían sido definidos hasta el momento, debido al escaso número de genes clonados y por tanto no podíamos calcular el CBI o el Nc de sus genes. Para salvar este inconveniente, definimos un nuevo índice, el ICDI (Índice de desviación intrínseca de codones), cuyo cálculo se explica en la tabla VII. Conceptualmente este índice se encuentra más próximo al Nc que al CBI pero tiene la ventaja de que no requiere un conocimiento previo de los codones óptimos de la especie. El rango teórico de valores está comprendido entre 0 y 1; tomando el valor 1 un gen que emplease siempre el mismo codón para un aminoácido y 0 aquél que emplease en igual proporción todos los posibles tripletes para cada aminoácido. Presenta la ventaja sobre el Nc de que no se pueden dar indeterminaciones matemáticas, como 1/0, que se producen en el cálculo cuando hay únicamente dos tripletes sinónimos para un aminoácido presente una sola vez en toda la proteína.

Una vez calculados los ICDI para los 25 genes de *K. lactis* (tabla III) y al comparar sus valores con los de los índices previamente analizados, encontramos una alta correlación positiva con Nc (0,994) y con el CBI (0,936). La existencia de esta correlación positiva nos llevó a considerar este índice como idóneo para el estudio del *bias* en los genes citocromo *c* de levaduras.

En la tabla VII se muestran los valores del ICDI para los genes citocromo *c* de diferentes levaduras. Se obtuvieron valores mayores de 0,5 para los genes citocromo *c* de *K. lactis*, *S. occidentalis* y *C. glabrata*; los dos genes citocromo *c* de la levadura *S. cerevisiae* y el correspondiente a *S. pombe* tomaron valores por debajo de 0,35.

Aquellas especies que alcanzaron mayores valores para los índices ICDI o CBI están clasificadas como respiradoras aerobias, mientras que *S. pombe* y *S. cerevisiae* son de respiración limitada (Alexander y Jeffries, 1990). Parece por tanto que existe una correlación entre la capacidad respiratoria y el *bias* de los genes citocromo *c* de levaduras, probablemente debida a una mayor expresión de los genes citocromo *c* en aquellas predominantemente respiradoras. Al analizar la expresión de *KICYC1* respecto a *CYC1* de *S. cerevisiae*, como se verá mas adelante, comprobamos que efectivamente los niveles de expresión de *KICYC1* son mayores que los de su homólogo en *S. cerevisiae*.

Tabla VII. Preferencia en el uso de codones de diferentes levaduras y características metabólicas de las especies correspondientes.

	ICDI	Nc	CBI	M. T.	Gf/Gr	Referencia
<i>K.lactis</i>	0,68	26,94	0,85	AR	----	Freire <i>et al.</i> , 1992
<i>S. occidentalis</i>	0,61	29,34	----	AR	0	Amegadzie <i>et al.</i> , 1990
<i>C. glabrata</i>	0,57	31,30	----	----	----	Clark-Walker, 1991
<i>S. cerevisiae</i> (<i>CYC1</i>)	0,30	41,86	0,47*	AF (RL)	49,0	Smith <i>et al.</i> , 1979
<i>S. cerevisiae</i> (<i>CYC7</i>)	0,35	44,68	0,16*			Montgomery <i>et al.</i> , 1980
<i>S. pombe</i>	0,27	45,80	0,42	AF (CNRL)	∞	Russell y Hall, 1982

AR: respirador aerobio, AF: fermentador aerobio, RL: respiración limitada. CNRL: Crabtree negativa, respiración limitada. Gf/Gr: radio glucosa fermentada/ glucosa respirada. MT: tipo metabólico (Gancedo y Serrano, 1989; Alexander y Jeffries, 1991)

*Datos de Sharp y Cowe 1992.

El Índice de Desviación Intrínseca de Codones (ICDI) se calculó según se explica a continuación. En primer lugar el valor S_k para cada uno de los 18 aminoácidos con una degeneración de codones de K veces se calculó :

$$S_k = \sum (n_i - 1)^2 / k(k-1)$$

en donde n_i es el valor RSCU para el codón i y k es el valor de degeneración 2, 3, 4 ó 6 tripletes codificando para el mismo aminoácido.

El valor ICDI para un gen es:

$$ICDI = (\sum S_2 + S_3 + \sum S_4 + \sum S_6) / 18$$

Un gen con un alto *bias* que utilice un único codón por aminoácido, tomará el máximo valor para éste índice, 1 y un gen que utilice por igual todos los codones tomará un valor de 0.

ESTUDIO DE LA SECUENCIA DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN:

Al analizar la secuencia del flanco 5' del gen *KICYC1* encontramos los elementos que se citan a continuación y que se pueden ver detallados en la figura 15.

```

CAAACGCACAACGGGAAACCAATGAGAAAAAA
GTCTCAGAGGCTTCACAGAATTTGGCTCATCTC
GTGTCTT-298GACCGATGTTCCCG-284AAATGATAGACT
TGTTTCGAAGCATTTTT-255CGGTTTAAGTAG-241TAA
AAACAGGTAGGAGAAAAATTTTAGTATGCGCA
-206CTATGGTTT-193GTTGATAATTT-185CATATA-177ACTAA
-172CATATTA-165AGATTTGATATTCGATTGAATTTGAT
GTTTCTTTAGCAAG-127TCTTTTTCGCGTTTCTTT
TTTCTCCTTTCTATCTTAAT-86TAAAG-83TTTCCCAA
ACTAT-68-67CAGTATTA-61AGGATTGATTCGTCAAATCA
AATAACTGTTACACAACCAACACA-16ACTAATATA
AAG-6TCATA

-1ATG CCA GCT CCA TAC AAG AAG GGT TCC
Met Pro Ala Pro Tyr Lys Lys Gly Ser

```

Figura 15. Elementos encontrados en la región promotora de *KICYC1*. UAS1A, UAS1B, UAS2 --- TATA, ||||| elemento rico en pirimidinas, ~ ~ ~ RPG.

Existen varios candidatos a TATA boxes en las posiciones -185, -171, -91, -66 y -15. En el promotor del *CYC1* de *S. cerevisiae* se ha descrito la existencia del llamado *elemento rico en pirimidinas* situado entre los elementos TATA y el punto de inicio de la transcripción (McNeil, 1988). También se ha descrito en el promotor del gen *CYC0* *S. occidentalis* (Amegadzie *et al.*, 1990) este elemento parece estar implicado en evitar la acumulación de mensajeros cuyos extremos 5' comiencen *upstream* de esta secuencia y contiene señales que son necesarias para la formación de extremos 3' maduros en el RNA mensajero. Entre las posiciones -126 y -92 del promotor del gen *KICYC1* se encuentra un segmento de 34 pb rico en pirimidinas. Aparece también una secuencia que encaja en el consenso de la secuencia RPG presente en los promotores de los genes que codifican para las proteínas ribosómicas (Nieuwint *et al.*, 1989).

También hallamos motivos que presentan homología con las secuencias UAS reconocidas por los factores reguladores HAP1 y el complejo HAP2/3/4, implicadas en la regulación transcripcional mediada por hemo o por fuentes de carbono, estas secuencias reguladoras se encuentran en el promotor de genes relacionados con funciones respiratorias. Existe una secuencia, que se extiende de -303 a -208 en la hebra codificadora, homóloga a la secuencia del UAS1A del gen *CYC1* de *S. cerevisiae* (Lalonde *et al.*, 1986) y sobre la que los factores transcripcionales HAP1 y RC2 ejercen su papel regulador (Pfeifer *et al.*, 1987b). En la figura 16, se puede apreciar que esta homología se mantiene con respecto a la secuencia consenso definida para los dos citocromos de *S. cerevisiae* (Cerdán y Zitomer, 1988) que se ha encontrado posteriormente en otros genes relacionados con funciones respiratorias (Zitomer y Lowry, 1992).

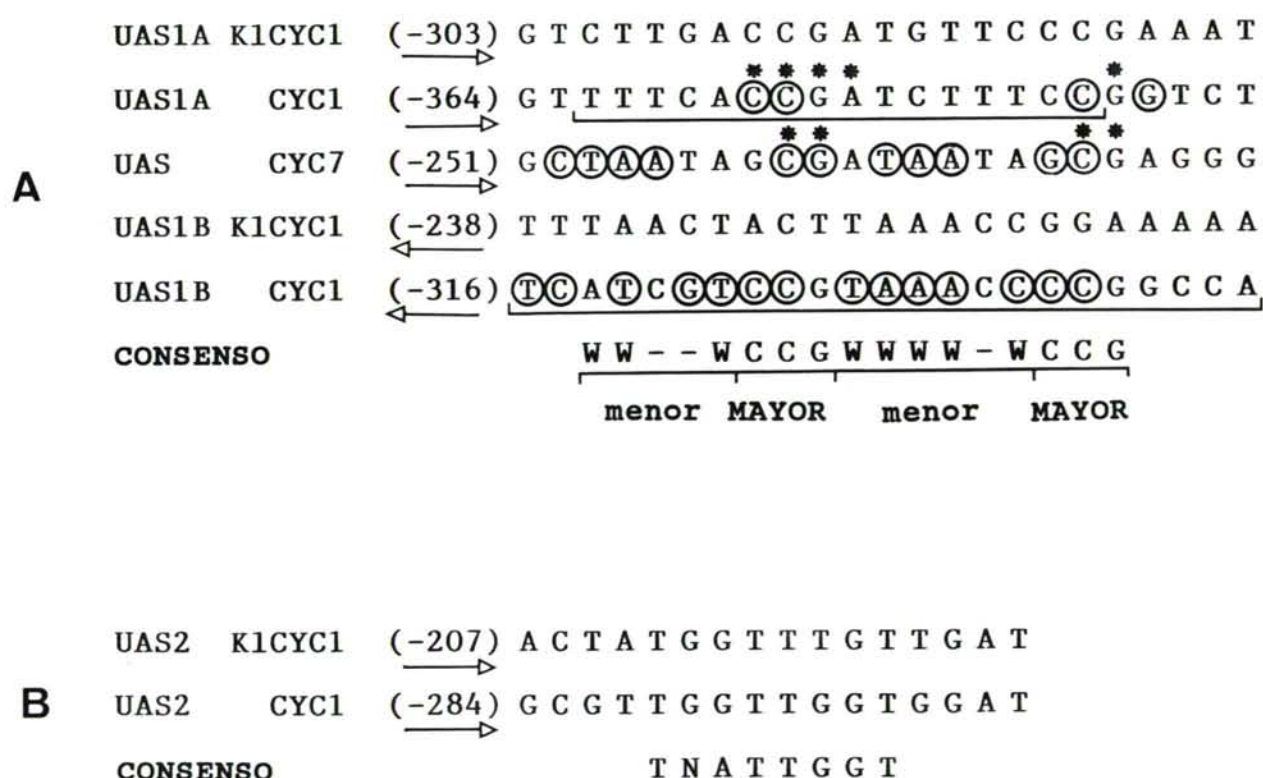


Figura 16. A-Sitios de unión para HAP1 en distintos citocromos (Zitomer y Lowry, 1992), incluyendo la secuencia consenso encontrada en *K1CYC1*. Las regiones subrayadas representan áreas protegidas contra la digestión por DNasa en la hebra que se muestra. Los nucleótidos rodeados por un círculo representan aquellos implicados en los contactos con la proteína según experimentos de interferencia de la metilación (Pfeifer *et al.*, 1987a y 1987b). Las mutaciones que causan la disminución de la expresión génica se señalan con un asterisco (Lalonde *et al.*, 1986; Zitomer *et al.*, 1987). B comparación del sitio de unión de HAP2/3/4 en *CYC1* con la secuencia hipotética en *K1CYC1*. Las flechas indican la orientación del sitio en la hebra codificadora (----->) o la hebra complementaria (<-----). W=A o T. Menor y mayor hacen referencia a los surcos en la doble hélice.

En nuestro análisis encontramos otra región entre las posiciones -260 y -238 en la hebra codificadora que presenta homología con el UAS1B del *CYC1* (Pfeifer *et al.*, 1987b) pero en este caso la coincidencia con la secuencia consenso es menor.

Entre las posiciones -207 y -192 encontramos la secuencia TATGGTTTGTTG, encuadrable en el marco de la secuencia consenso del UAS2, situado en la región promotora del *CYC1*; Cuando la levadura crece sobre fuentes de carbono no fermentables, los factores HAP2/3/4 se unen a esta región activando la transcripción (Forsburg y Guarente 1989b; Zitomer y Lowry, 1992).

ANÁLISIS DE LOS MENSAJEROS GENERADOS POR *K1CYC1*

Determinación del punto de inicio de la transcripción

Para conocer el o los posibles puntos de inicio de la transcripción utilizamos la técnica de S1-mapping (Favorolo *et al.*, 1980) El RNA de la línea JA6 de *K. lactis*, el RNA transferente así como el DNA de PBR322 / *HpaI* marcado en su extremo 3' fué cedido amablemente por K. Breuning.

Muestras de 50 µg de RNA, procedente de la cepa JA6, crecido en glucosa y glicerol, fueron desnaturalizadas e hibridadas con los fragmentos *EcoRV-PstI* (de 700 y 1.200 pb respectivamente) del vector pART10 marcados con P³² en su extremo 5' y digeridas con nucleasa S1.

Tras la electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes, el análisis de la autorradiografía obtenida nos permitió comprobar que únicamente el fragmento *PstI-EcoRV* de 700 pb conteniendo la región promotora del gen hibridaba con el mRNA siendo protegido de la digestión con la nucleasa S1 a lo largo de aproximadamente 380 nucleótidos en dirección 5' del extremo marcado lo que se traduce en la aparición de una señal clara en la posición correspondiente a 380 pb (Figura 17). El control negativo se hizo hibridando el DNA marcado con RNA transferente y en este caso el DNA marcado se degradó por completo, no apareciendo bandas a la misma altura.

Este resultado indica que el punto de inicio de la transcripción se encuentra a 380 pb del sitio *EcoRV* de pART10, siendo la intensidad de la banda protegida menor en

glucosa que en glicerol lo que fué un primer indicio de que la transcripción del gen está sujeta a represión catabólica.

La distancia, 380 pb, indica que el punto de inicio se sitúa aproximadamente en la posición -81, pero en todo caso se encuentra en posición 3' respecto al elemento rico en pirimidinas, quedando dos secuencias TATA, ATATATA (posición -185) así como TATTAA (posición -171) situadas 5' de dicho elemento. Esto nos hace suponer que probablemente el elemento rico en pirimidinas (McNeil, 1988) también en este caso cumple su función de evitar la acumulación de transcritos que se originen en posición 5' respecto del mismo.

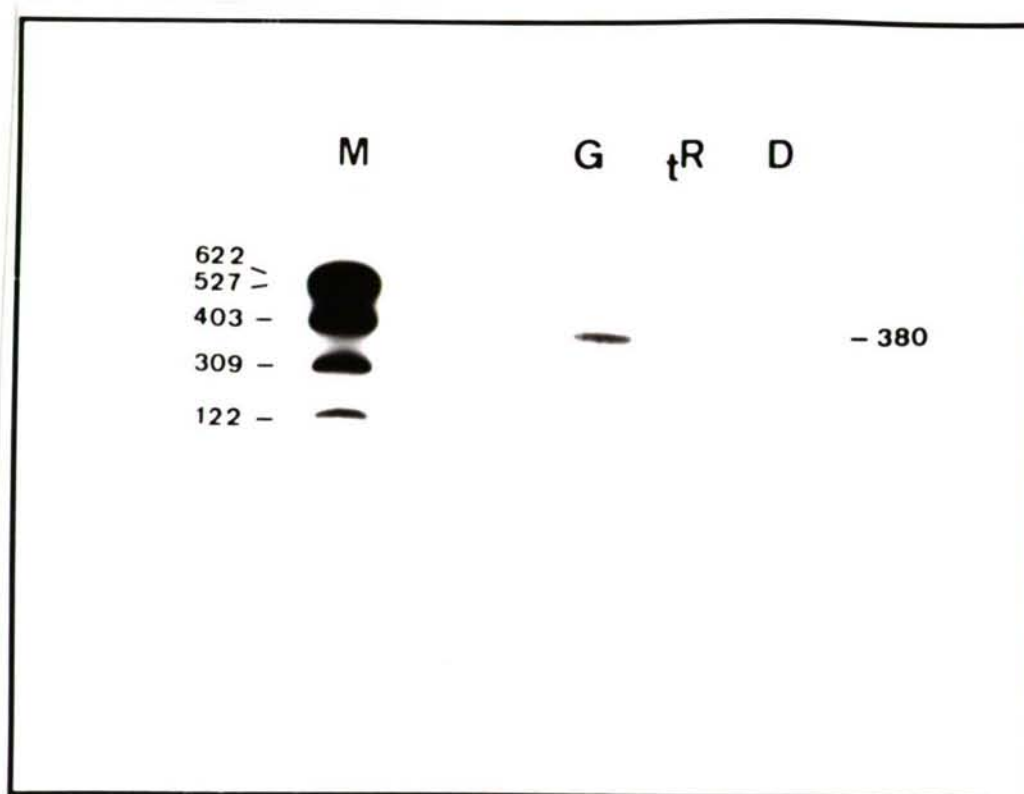


Figura 17. Experimento de digestión con nucleasa S1. D RNA aislado de cultivos en dextrosa, G RNA aislado de cultivos en glicerol. tR: RNA transferente. M Marcador (pBR322/*Hpa*I).

Cálculo de tamaño de los transcritos

Independientemente de las señales reguladoras que modifican su expresión, el gen *KICYC1* genera dos transcritos. El cálculo de los tamaños de los mensajeros de *KICYC1* lo hicimos basándonos en 2 referencias:

1- El tamaño de las bandas de marcadores de RNA (marcador III) y DNA (marcador III) de Boehringer. Los marcadores fueron desnaturalizados antes de la separación electroforética de sus componentes. Tras la electroforesis fueron teñidos y calcados (figura 18a).

2- tamaño de las bandas de RNA ribosómico (Figura 18b).

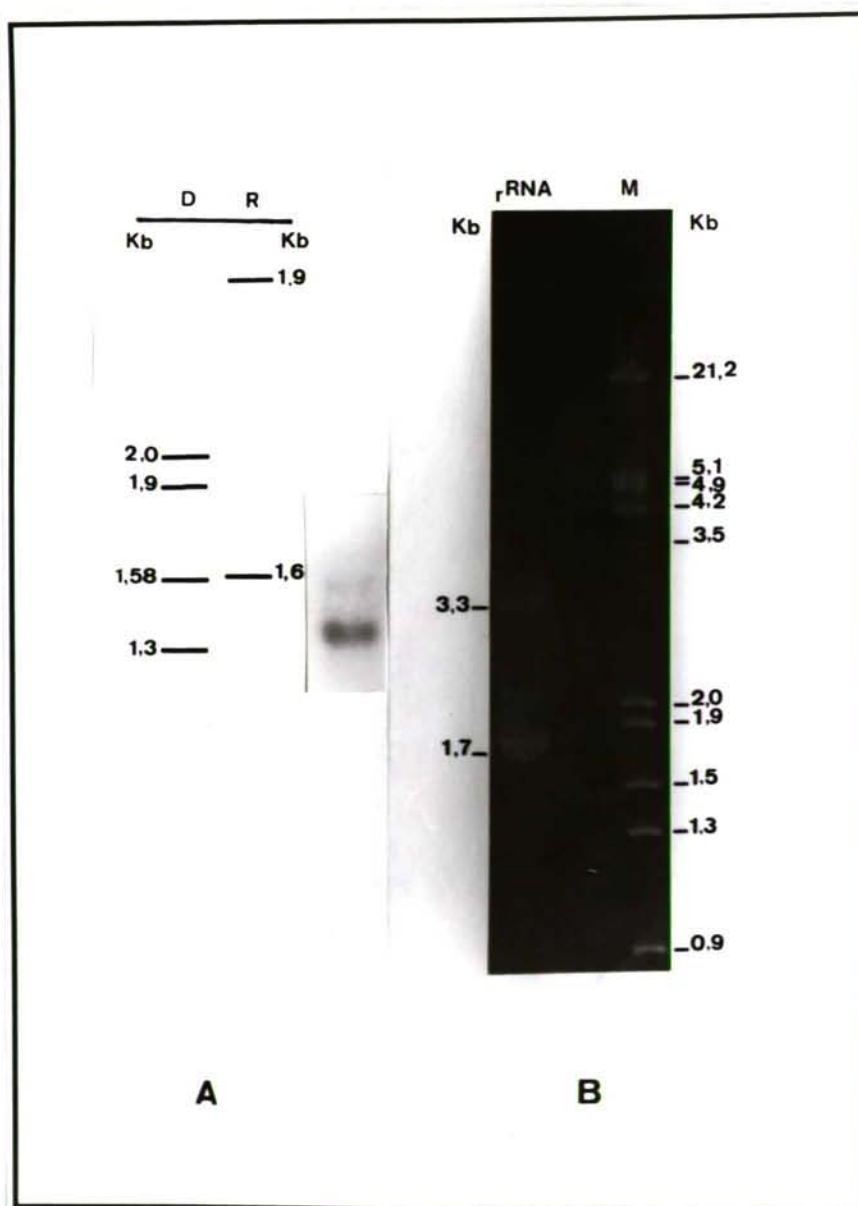


Figura 18. A Posición de los mensajeros de *KlCYC1* frente a los marcadores de DNA (D) y RNA (R) de Boehringer. B Posiciones del marcador III de Boehringer respecto a las bandas de RNA ribosómico de *K. lactis*. En ambos casos las electroforesis se efectuaron en geles de formaldehído al 1,5%.

Los tamaños de las bandas de RNA ribosómico, mayoritario en una muestra de RNA total, en *S. cerevisiae* son 3.360 (25S) y 1.710 (18S) (Oliver y Warmington, 1989). La migración conjunta del marcador III de Boehringer con RNA total nos permitió calcular los tamaños del RNA ribosómico en función de marcador de DNA desnaturizado. Los valores obtenidos 1.700, 3.300 encajan con los tamaños del RNA de *S. cerevisiae*. La banda de mayor tamaño del mRNA de *KICYC1* aparece por debajo de la banda de 18S (figura 18b). Utilizando cualquiera de los dos métodos descritos, concluimos que el tamaño estimado para los dos transcritos es de 1.600 y 1.300 bases.

A fin de comprobar si nos encontrábamos con RNA en dos niveles diferentes de procesamiento, procedimos a la obtención de RNA poli-A. El análisis por Northern de este RNA mostraba de nuevo la existencia de ambos mRNAs (figura 19).

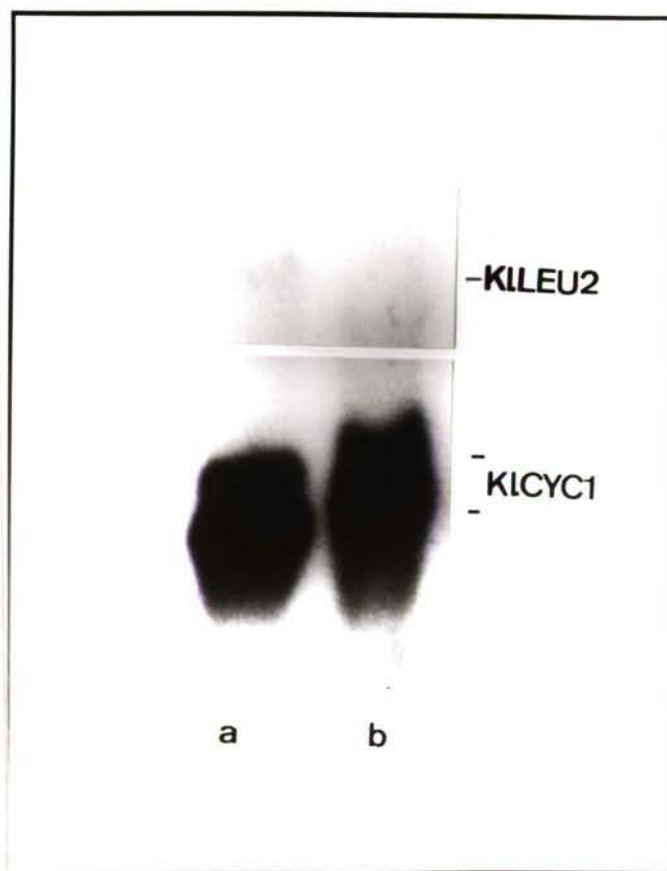


Figura 19. Comparación de los transcritos de *KICYC1* utilizando a: RNA poli-A y b. RNA total.

Los experimentos de digestión con nucleasa S1, ya descritos, nos indicaron la existencia de una región de inicio mayoritaria para la transcripción, la diferencia en tamaño de los dos transcritos ha de deberse por tanto a diferentes puntos de terminación. A fin de comprobar esta hipótesis se prepararon dos sondas contiguas de la región 3': *EcoRV-NciI*

(fragmento de 186 pb, posiciones 669-855 de la región secuenciada que incluye el final de la ORF), *NciI*-*NciI* (600 pb) y *NciI*-*HindIII* (485 pb situado en el extremo 3' del clon pART10).

La aparición de dos bandas de igual intensidad al hibridar con los fragmentos *EcoRV*-*NciI*, *NciI*-*NciI* señaló idéntica homología con ambos transcritos, Sin embargo, el fragmento de 485 pb, mostró mayor grado de homología con la banda de mayor tamaño, puesto que la señal de hibridación es más fuerte. Parece por tanto que las señales de terminación para ambos transcritos se encuentran en esta región (Figura 20).

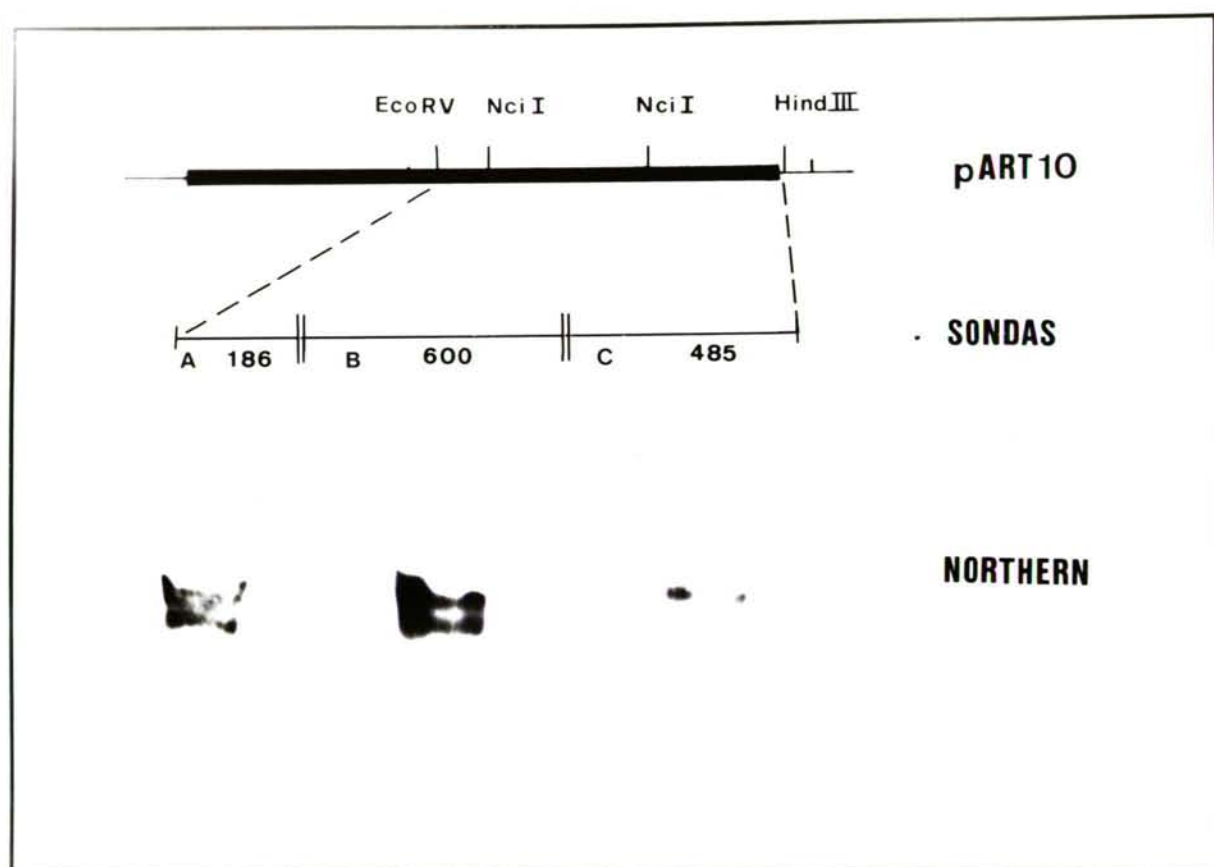


Figura 20. Experimento de hibridación con sondas de la región 3'. A sonda 186 pb *EcoRV*-*NciI*. B sonda 600 pb *NciI*-*NciI*. C sonda 485 pb *NciI*-*HindIII*.

Los experimentos anteriores indican que el final de la transcripción se encuentra en la región 3' del gen que no está secuenciada. Datos previos del análisis de la secuencia indican que en la región 3' del gen *KICYCI* se encuentran regiones ricas en T, A, sin embargo, ninguna coincide exactamente con las secuencias propuestas para la

terminación del *CYC1*, excepto una secuencia TATATA situada a 231pb en dirección 3' del sitio *NciI*, pero que no se repite por lo que es posible que o bien la secuencia de terminación sea distinta a la de *CYC1*, o bien utilice dos secuencias distintas para la terminación de los dos transcritos. Como veremos a continuación ambos mensajeros se encuentran bajo el mismo sistema de regulación transcripcional.

EXPRESIÓN DEL GEN *KICYC1*

En *S. cerevisiae* el gen *CYC1* que codifica para el iso-1-citocromo *c* se ve sometido a una doble regulación: regulación por oxígeno, mediada por hemo, y regulación por fuentes de carbono (Lowry *et al.*, 1983; Lowry y Zitomer 1984; Guarente *et al.*, 1984; Forsburg y Guarente, 1989a y b; Pfeifer *et al.*, 1987a y b; Zitomer y Lowry 1992; Poyton y Burke 1992). Al analizar la región promotora del gen *KICYC1* (apartado "Estudio de la secuencia de la región promotora del gen") encontramos secuencias homólogas a los sitios de unión del factor HAP1 y del complejo HAP2/3/4 a través de los cuales se activa la transcripción de *CYC1* en presencia de oxígeno o de fuentes de carbono no fermentables; esto nos llevó al estudio de estos dos tipos de regulación sobre el gen *KICYC1*.

Expresión de *KICYC1* en condiciones aerobias e hipóxicas:

Capacidad de K. lactis de crecer en condiciones anaerobias:

Antes de iniciar los estudios de regulación por oxígeno de *KICYC1* comprobamos la capacidad de crecimiento en condiciones anaerobias de *K. lactis*; debido al predominio de la respiración sobre la fermentación, en esta especie no estaba clara su capacidad de crecimiento en anaerobiosis, y era necesario verificarlo. En un principio utilizamos los generadores de anaerobiosis de Biomerieux, consiguiendo un ambiente hipóxico en jarras de anaerobiosis. En la figura 21 se aprecia la curva de crecimiento de Y1140 en YPD suplementado con tween 80 y ergosterol, necesarios para la síntesis de lípidos de la membrana. De su observación resulta evidente la capacidad de la cepa salvaje de crecer en condiciones hipóxicas.

En condiciones aerobias y medios fermentables Y1140 alcanza valores de absorbancia mayores que en anaerobiosis pero en estas condiciones también se produce crecimiento (figura 21).

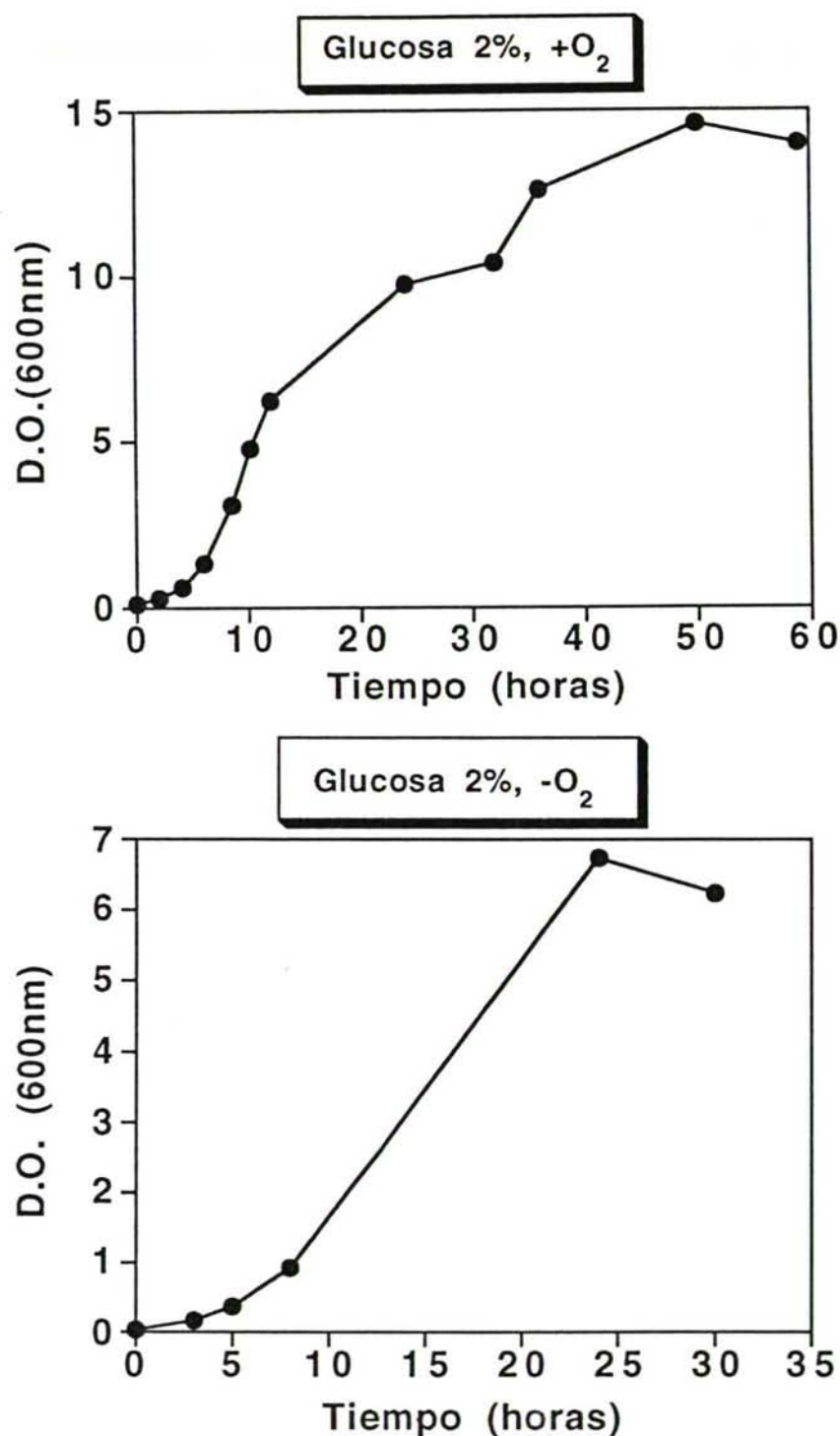


Figura 21. A Crecimiento de la cepa salvaje Y1140 en YPD al 2% y en condiciones aerobias. B crecimiento en anaerobiosis utilizando el sistema de Gas-Pack, partiendo de un pre-cultivo en fase estacionaria se inoculó un medio de YPD al 2% que fué suplementado con tween 80 y ergosterol. El medio inoculado se repartió en varios matraces que se pusieron independientemente en anaerobiosis con objeto de tomar muestras a lo largo del tiempo sin variar las condiciones anaerobias del resto de los cultivos.

Ante la posibilidad de que con el sistema anterior no se consiguiese un ambiente anaerobio total y dado que en las referencias bibliográficas los niveles de expresión de citocromos se estudian en células crecidas en anaerobiosis generada mediante burbujeo con nitrógeno (Lowry *et al.*, 1983; Lowry y Zitomer 1984; Amegadzie *et al.*, 1990), verificamos también el crecimiento de *K. lactis* en estas condiciones. En la figura 22, se aprecia el resultado del experimento de crecimiento de Y1140 en anaerobiosis generada por burbujeo de nitrógeno. En este experimento de 4 horas en anaerobiosis se observa crecimiento en el medio con glucosa, mientras que en el medio con glicerol (no fermentable) no se aprecia incremento significativo en la absorbancia. Este resultado concuerda con el crecimiento en Gas-pack y nos permite concluir que *K. lactis* es capaz de crecer, aunque lentamente, en condiciones anaerobias a expensas de su capacidad fermentadora.

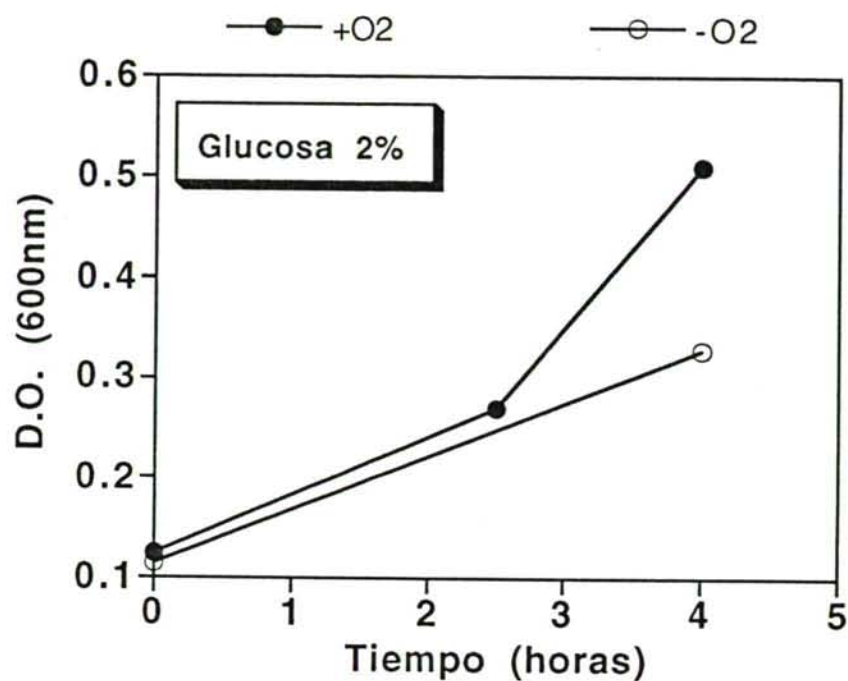
Niveles de mensajero en aerobiosis-anaerobiosis:

Los niveles de expresión del gen *KICYC1*, en la cepa Y1140, se ven drásticamente reducidos en condiciones de baja presión de oxígeno generada por el sistema de Gas-Pack. Bajo estas condiciones, la adición de hemina aumenta los niveles de mRNA de *KICYC1* tanto en glucosa como en glicerol (Figura 23). En aerobiosis y anaerobiosis, la adición de hemina estimula la transcripción del *KICYC1* en ambas fuentes de carbono. Cuando la anaerobiosis se produce con N₂ se observa el mismo patrón de regulación por oxígeno. La presencia de oxígeno en el medio provoca en *KICYC1* una respuesta similar a la de los genes *CYC1* y *CYCo* de *S. cerevisiae* y *S. occidentalis*.

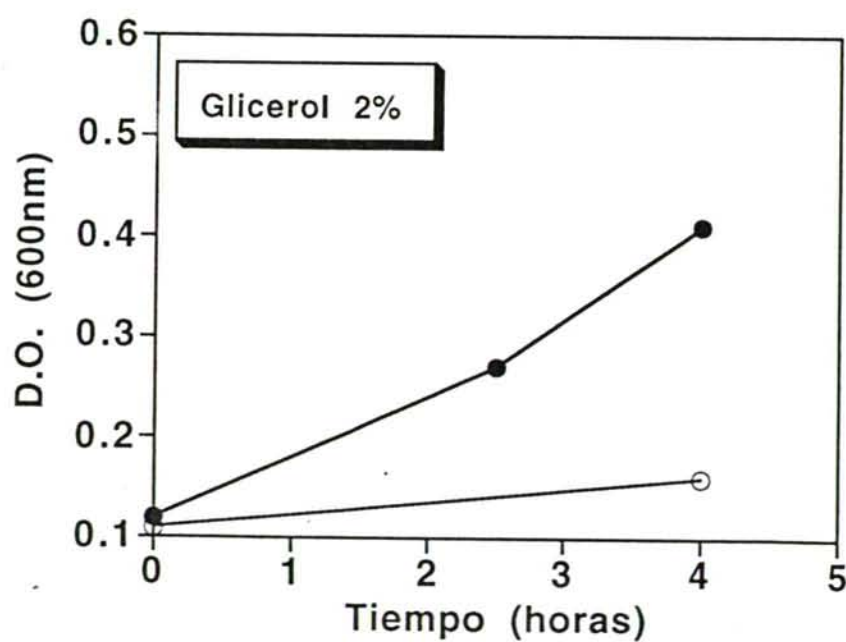
Expresión en diferentes fuentes de carbono:

Niveles de mensajero en medios fermentables y no fermentables.

Se llevaron a cabo experimentos de Northern blot empleando RNA de la cepa Y1140 creciendo en glicerol al 2% (y en glicerol suplementado con hemina), rafinosa al 2%, glucosa al 2%, o suero de leche, medio natural de crecimiento de esta levadura. En la figura 23B se pueden apreciar los niveles de *KICYC1* en tales fuentes. Los menores niveles de expresión se producen en glucosa y en suero de leche; cuyo contenido en lactosa es del 5% (Siso *et al.*, 1992), por tanto hay una represión por glucosa de la expresión de *KICYC1* en estas condiciones.



A



B

Figura 22. Capacidad de crecimiento de Y1140 en anaerobiosis generada con Nitrógeno. **A** medio fermentable (glucosa al 2%). **B** medio no fermentable glicerol al 2%. En ambos casos se presenta el crecimiento paralelo en condiciones aerobias (+O₂).

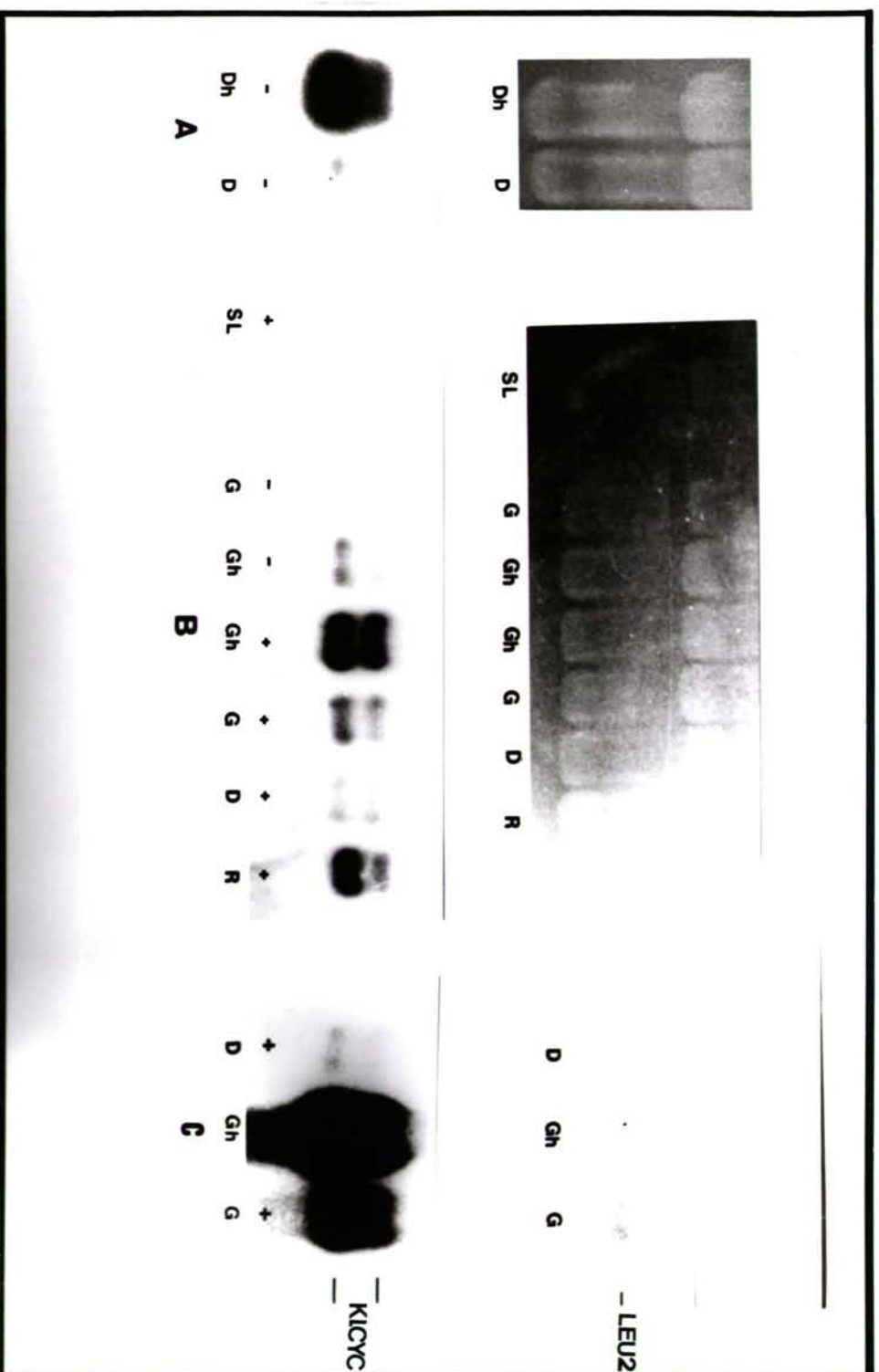


Figura 23. A efecto de hemina sobre la transcripción de *KICYC1* en células creciendo en glucosa h: hemina. B regulación por fuente de carbono y efecto de la adición de hemina sobre células creciendo en glicerol. D glucosa, R rafinosa, G glicerol, SL suero de leche (lactosa al 5%). C doble hibridación: sonda *KICYC1* fragmento *PstI-PstI* de pART10. Sonda *KLEU2* fragmento *HindIII-HindIII* (1,1Kb) de pAWJ1-1. (+) Crecimiento en condiciones aerobias. (-) Crecimiento en condiciones anaerobias generadas mediante burbujeo con nitrógeno.

Ferrero y colaboradores (1978) encontraron que si bien CBS 2359 (Y1140) es una cepa en la que existe represión catabólica, la tasa de respiración, medida en fase estacionaria del cultivo, no varía en diferentes concentraciones de glucosa, por lo que consideraron que no hay represión por glucosa de la respiración. Sin embargo, y en contra de lo que afirmaron estos autores la expresión de *KICYC1* está sometida a un efecto neto de represión por glucosa, si bien no podemos descartar que la disminución sea debida a una menor estabilidad de los mensajeros en glucosa.

Cuantificación de los niveles de expresión:

Estos análisis nos permitieron comprobar en primer lugar que los dos transcritos de *KICYC1* presentan la misma regulación, puesto que las variaciones en la expresión afectan a ambas por igual. Los datos obtenidos indican una represión por glucosa de 2,1 a 2,4 veces y un aumento de los niveles de mRNA entre 3,7 y 6,8 veces al adicionar hemo. Los niveles de represión por glucosa no son tan grandes como los que se citan en la bibliografía para otros genes de *S. cerevisiae* incluso para el gen *CYC1* (Zitomer y Hall, 1976), pero este bien puede ser un efecto debido a diferencias entre cepas.

EXPRESIÓN HETERÓLOGA

El gen *KICYC1* complementa la carencia de *CYC1* en *S. cerevisiae* y se ve sometido a una regulación similar a la de este gen (represión catabólica y disminución de la expresión en condiciones anaerobias). Con estos antecedentes decidimos estudiar la expresión de *KICYC1* en diferentes líneas de *S. cerevisiae* mutantes para genes reguladores específicos que afectan a la expresión de citocromos. Para ello se transformaron las líneas mutantes, y los correspondientes controles, con los plásmidos centroméricos que se describen a continuación:

pCAF9: fragmento *PstI-PstI* de pART10 clonado en el sitio *PstI* de del plásmido YCpLac33. Presenta la misma orientación que pART10 (figura 24).

pCAF10: fragmento *PstI-PstI* de pART10 clonado en el sitio *PstI* de del plásmido YCpLac22. Presenta la misma orientación que pART10 (figura 25).

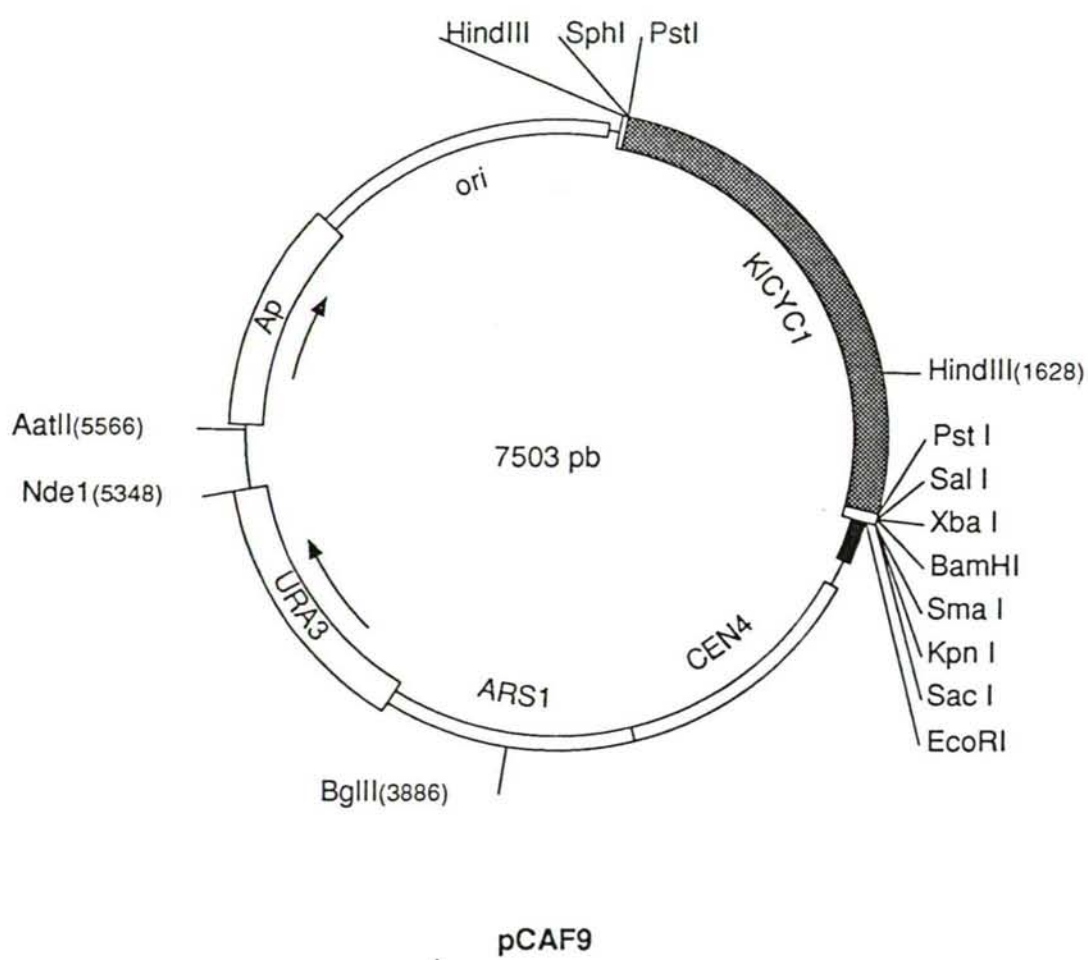


Figura 24. Plásmido pCAF9

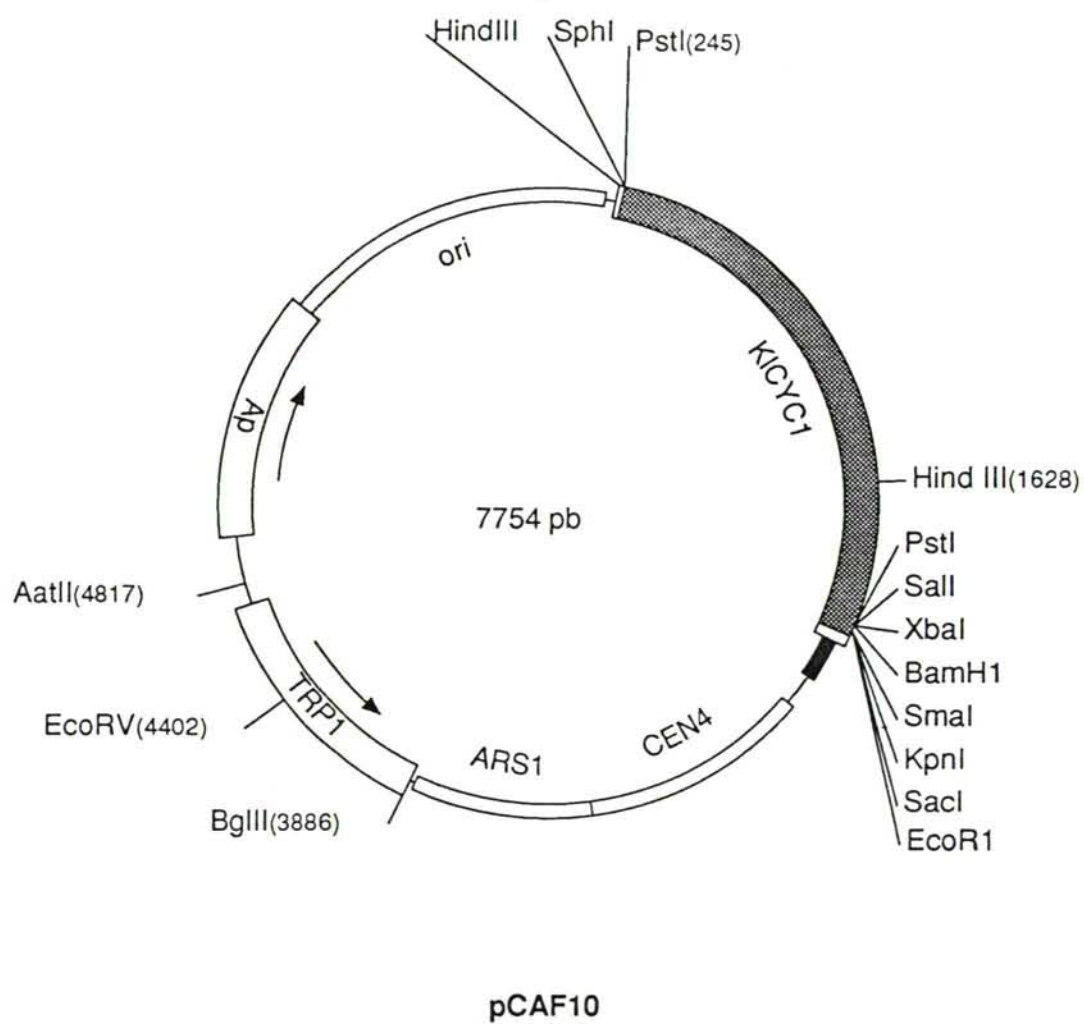


Figura 25. Plásmido pCAF10

Los experimentos de Northern blot tanto en líneas salvajes para la expresión de citocromos α LRI, aGHI, o ZW13, como en las mutantes mostró siempre la existencia de los dos transcritos de 1,6 y 1,3 Kb, tal como se había descrito en los estudios de regulación en *K. lactis*. Figuras 26-28, 30-34 y 36).

Comparación niveles de expresión *CYC1-KICYC1*:

El resultado del estudio del uso de codones de *KICYC1* en comparación con otros genes citocromo *c* de levaduras nos indicó que *KICYC1* es un gen con un alto ICDI lo que significa que utiliza sólo los codones preferentes de su especie, esta es una característica propia de los genes de alta expresión. Datos previos del uso de codones en el gen *CYC1* de *S. cerevisiae* (Ikemura, 1985; Sharp y Cowe, 1991) indican que no es un gen de alto *bias* y por tanto tampoco de alta expresión. En principio y desde un punto de vista teórico, esta diferencia se puede deber a que *K. lactis* es una levadura predominantemente respiradora mientras que *S. cerevisiae* es fermentadora (Alexander y Jeffries, 1991; Gancedo y Serrano, 1989).

Para comparar los niveles de expresión entre *CYC1* y *KICYC1* se transformaron las líneas de *S. cerevisiae* aGHI (salvaje) y ZW13 (*CYC*⁻) con el plásmido centromérico pCAF10; con el RNA aislado de estas líneas se realizó un experimento de Northern. Se utilizaron como sondas: i) un fragmento de 950 pb del plásmido pCAF9A amablemente cedido por E. Ramil; este plásmido tiene una delección en la región promotora de *KICYC1*; ii) un fragmento *XhoI-HindIII* de 850 pb, del plásmido *CYC1* 2.4 (Lowry *et al.*, 1983) que no incluye la región promotora; las sondas fueron marcadas con digoxigenina por el método de *random primed* y en la figura 26a, se aprecia el calibrado del marcaje de las sondas previo a su utilización.

Los resultados (figura 26b) muestran que los niveles de expresión de *KICYC1* en la cepa aGHI son similares a los que presenta en *K. lactis*. En estas condiciones la banda de *CYC1* se hace visible sólo en medio mínimo, más adelante profundizaremos en este punto. Se observa también un mayor nivel de expresión en la cepa ZW13 creciendo en glicerol respecto a aGHI; este hecho probablemente se deba a una diferencia entre cepas, característica previamente descrita en *S. cerevisiae* (Zitomer y Hall, 1976). El resultado obtenido indica que los niveles de mensajero de *KICYC1* en *S. cerevisiae* son mayores que los de *CYC1* y está de acuerdo con la correlación alto *bias*- alto nivel de expresión.

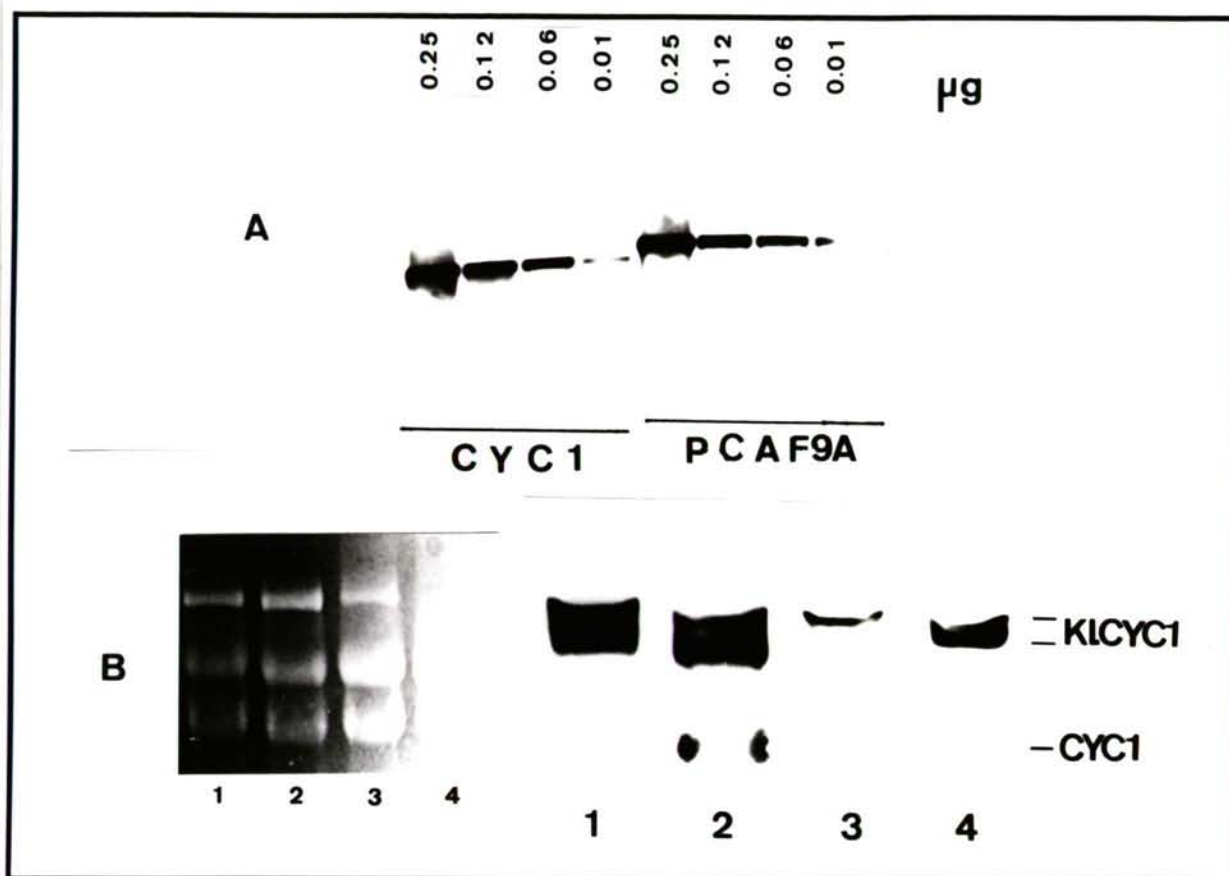


Figura 26. A Southern-blot para calibrar el marcaje de las sondas, las hibridaciones se realizaron por separado y la reacción de color conjuntamente para los dos filtros. B Northern de cuantificación de los niveles de expresión, a la izquierda del Northern se presenta el gel teñido como control de carga. Como sondas se utilizaron aquellas previamente calibradas según se muestra en la parte A de la figura. Las células de *S. cerevisiae* fueron previamente transformadas con pCAF10. Todas las cepas crecieron en glicerol al 2%. 1, ZW13 creciendo en YPG; 2 aGHI en CM-Trp; 3, aGHI en YPG; 4, Y1140 en YPG.

Regulación por *HAP1* y *HAP2*:

Como vimos previamente, al buscar homologías con el gen *CYC1* de *S. cerevisiae*, en la región promotora de *KICYC1* existen las secuencias CCG(N)₆CCG y TTGGTTTGT, que se ajustan a las secuencias consenso para la unión de los factores HAP1 y el complejo HAP2/3/4 respectivamente. Por otro lado los estudios de la expresión de *KICYC1* mostraron que presenta una regulación por hemo y fuente de carbono similar a la que opera sobre en el gen *CYC1*.

A fin de conocer si el factor regulador HAP1 de *S. cerevisiae* actúa sobre la región upstream de *KICYC1* se transformaron las líneas de *S. cerevisiae* ZW13 salvaje para HAP1 y ZW10, portadora de la mutación *HAP1-16*, con el plásmido centromérico pCAF10. En *S. cerevisiae* ésta mutación produce una disminución de la expresión del *CYC1*, y un aumento en la expresión del *CYC7* en condiciones aerobias (Zitomer *et al.*, 1987). En la figura 27 se pueden apreciar los resultados. En condiciones aerobias los niveles de *KICYC1* se ven disminuidos en la cepa mutante para HAP1 respecto a la línea salvaje, por tanto la mutación *CYP1-16* afecta al gen *KICYC1* de modo similar a lo que ocurre con el gen *CYC1* de *S. cerevisiae*.

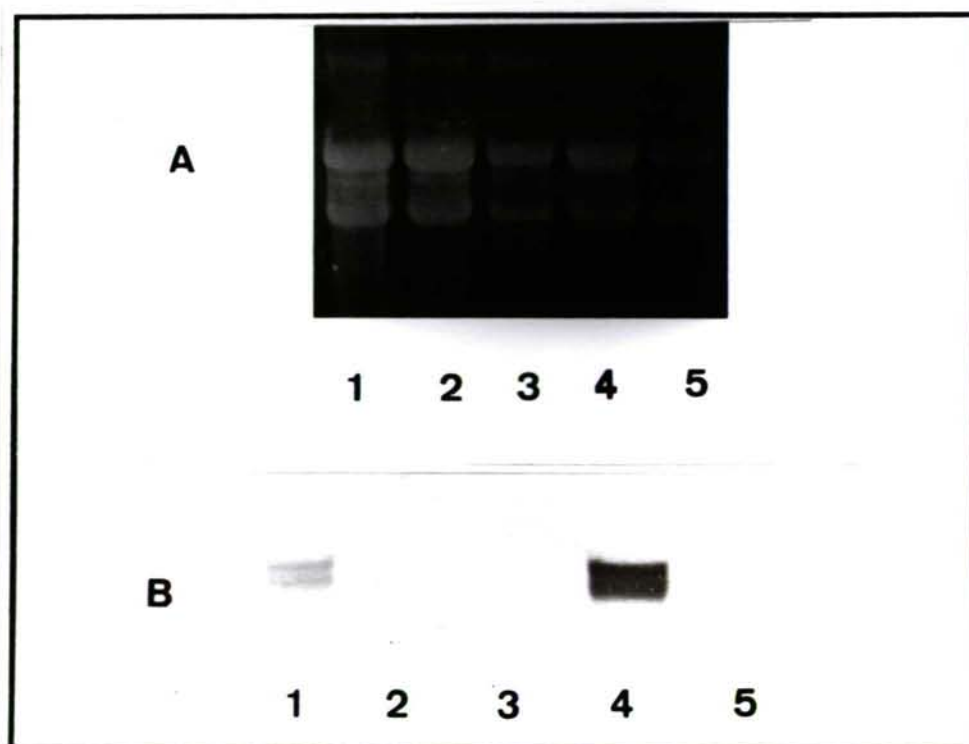


Figura 27. Efecto de la mutación *HAP1-16*. Las células de *S. cerevisiae* fueron previamente transformadas con pCAF10. Todas las cepas crecieron en glicerol al 2%. **A** gel teñido; **B** Northern blot. 1 ZW10 +O₂; 2 ZW10 -O₂; 3 ZW13 -O₂; 4 ZW13 +O₂; 5 Y1140 +O₂. Sonda fragmento *Pst*I-*Pst*I de pART10.

La disponibilidad de las cepas BWG1-7a (salvaje para HAP1 y HAP2/3/4) y LPY22 ($\Delta hap1::LEU2$, $CYC1\Delta UAS2$) nos permitió estudiar el efecto de las mutaciones de *HAP1* en otras líneas de *S. cerevisiae*; la línea JO1-1a ($\Delta hap2$) fué utilizada para conocer si la delección en *HAP2* afectaba a la regulación de *KICYC1*.

Se llevaron a cabo experimentos de Northern blot utilizando RNA total de las tres líneas transformadas con el plásmido pCAF9, creciendo en medio completo con glicerol al 2%, o en glicerol suplementado con hemina. La expresión de *KLCYC1* en las células BWG1-7a y ZW13 se aprecia en la figura 28a. Se observa el efecto de inducción por hemina y una disminución del mRNA en anaerobiosis. Los niveles de mRNA de *KICYC1* fueron menores que los de mRNA de *CYC1* en la cepa BWG1-7a posiblemente por una pérdida del plásmido al crecer en medio completo, puesto que esta cepa tiene un citocromo *c* funcional mientras que ZW13 no. Otra posibilidad sería que se estuviese produciendo una competición por los factores de transcripción entre las regiones reguladoras de ambos genes.

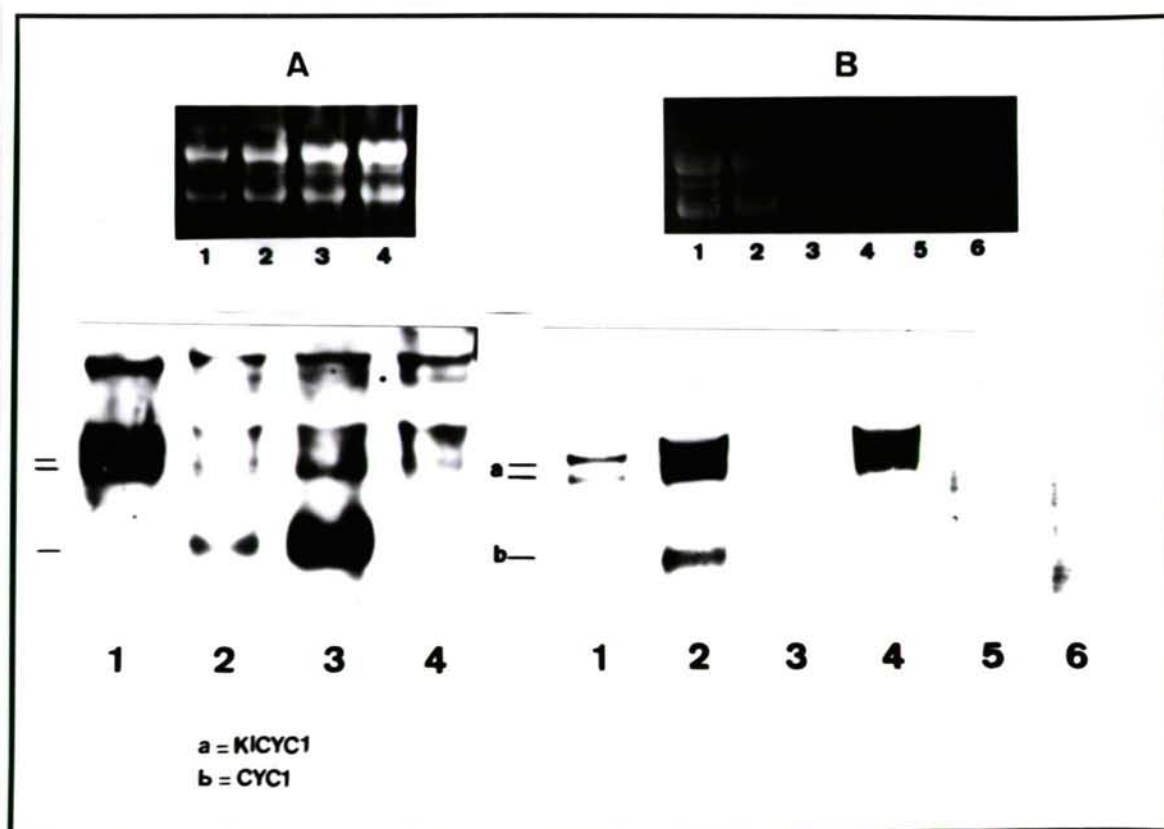


Figura 28. Efecto de otros mutantes *hap1* y mutantes *hap2* sobre *KICYC1*. Los mutantes de *S. cerevisiae* fueron previamente transformados con pCAF9. Fuente de carbono glicerol al 2%. A medio rico; 1 ZW13; 2 BWG1-7a; 3 BWG1-7a + hemina; 4 BWG1-7a -O₂; B medio CM-Trp. 1, BWG1-7a +O₂; 2 BWG1-7a +O₂ + hemina; 3 LPY22 +O₂; 4 LPY22 +O₂ + hemina; 5 JO1-1a +O₂; 6 JO1-1a +O₂ + hemina. Sondas: *CYC1*, fragmento *XhoI-HindIII* de *CYC1*-2.4; *KICYC1*: fragmento *PstI-PstI* de pART10.

Con objeto de aclarar este punto se llevaron a cabo extracciones de RNA total de las células BWG1-7a y LPY22, creciendo en medio CM-URA-Glicerol. En la figura 28b se puede apreciar que el gen *KICYC1*, en este medio, se expresa a mayor nivel que *CYC1*. La delección de *HAP1* en LPY22 hace disminuir la expresión de *KICYC1* respecto a la línea salvaje, por tanto la eliminación funcional de *HAP1* afecta a los niveles de transcripción del gen *KICYC1*. Este resultado corrobora el dato anterior en el mutante *HAP1-16*, y nos lleva a afirmar que *HAP1* regula la expresión de *KICYC1* en *S. cerevisiae*.

En la cepa LPY22 no hay inducción por hemo para *CYC1*, ya que esta cepa es además portadora de una delección en el UAS2. En ella *KICYC1* sí que resulta inducido por hemo, pese a la mutación de *HAP1*. Este resultado probablemente se deba al efecto de hemo en la activación mediada a través del UAS2 (Pinkham y Guarente, 1985; Zitomer y Lowry, 1992), dado que el clon portador de *KICYC1* contiene la región promotora homóloga al UAS2 intacta.

El gen *HAP2* de *S. cerevisiae* es esencial para la expresión de *KICYC1*, y las células JO1-1a (Δ hap2) transformadas con *KICYC1* fueron incapaces de crecer en lactato o glicerol. Para el experimento de la figura 28b, las células transformadas se cultivaron en glucosa al 2% hasta que alcanzaron una A_{600} de 0.5, a continuación se precipitaron, se lavaron en agua estéril y se resuspendieron en medio CM-Ura-Glicerol, manteniendo el cultivo durante 2 horas en agitación a 27 °C. Como cabía esperar por los resultados de crecimiento, no aparece mRNA de citocromo *c* en esta cepa.

Teniendo en cuenta estos datos parece claro que los genes *HAP1* y *HAP2* de *S. cerevisiae* ejercen un control sobre la expresión del gen *KICYC1*. Los resultados de regulación por oxígeno y fuente de carbono en *KICYC1* sugieren que en *K. lactis* existen factores homólogos a *HAP1* y *HAP2* que actúan regulando su expresión. De hecho *KIHAP2* y *KIHAP3* han sido recientemente clonados por otros grupos (*KIHAP2* M. Bolotin-Fukuhara; *KIHAP3* grupo de L.A. Grivel, datos no publicados). En nuestro laboratorio existen datos que indican la existencia de *KIHAP1* aunque el gen no ha sido todavía clonado.

En la figura 29 se explica de un modo esquemático la regulación de la transcripción de *KICYC1* y *CYC1* en las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este experimento.

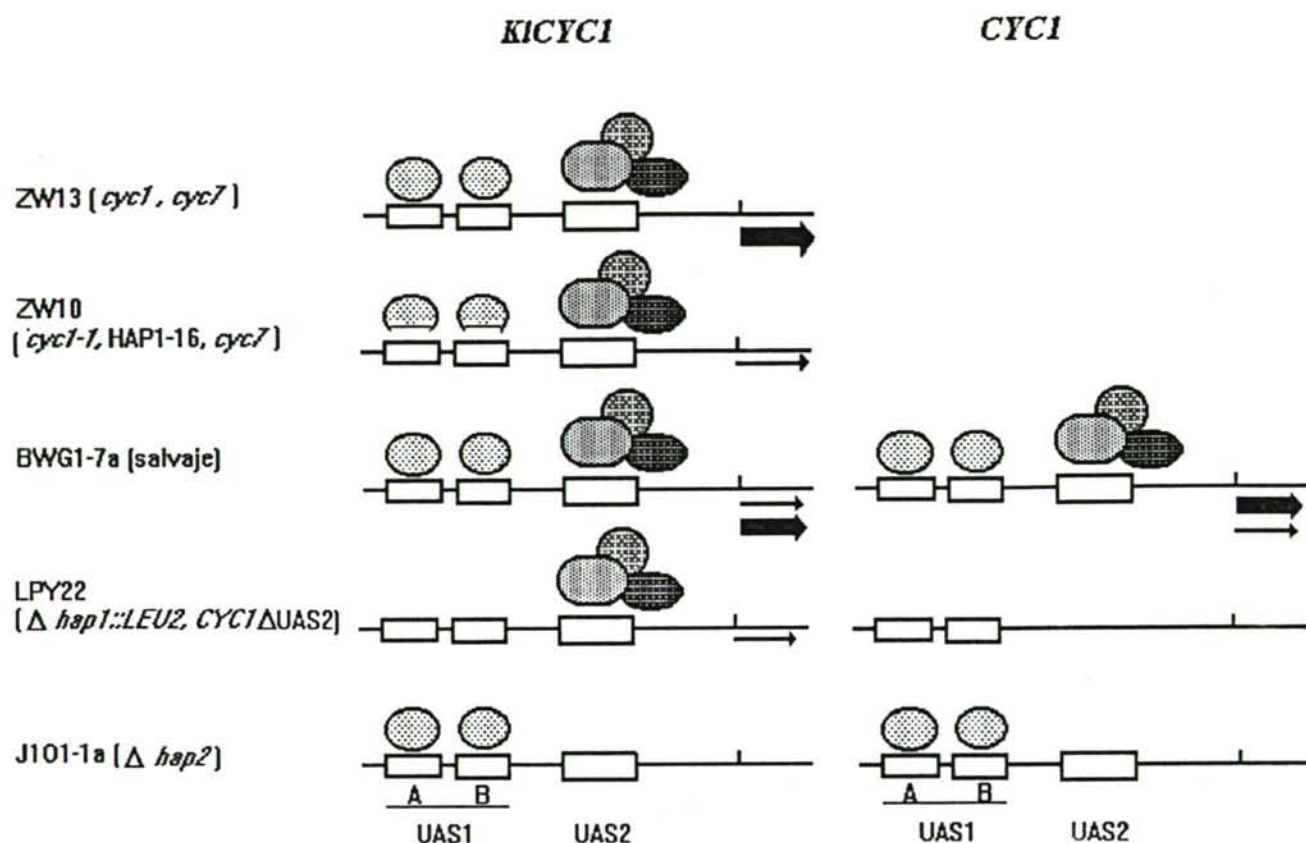
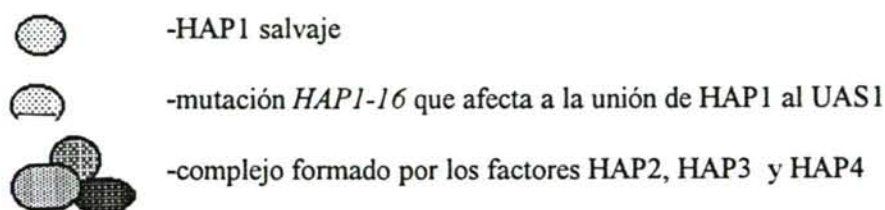


Figura 29. Expresión de *KICYC1* en líneas de *S. cerevisiae* salvajes y mutantes para los activadores transcripcionales HAP1 y HAP2.



Expresión en medios sintéticos con carencia para algún aminoácido:

La expresión del gen *KICYC1*, lo mismo que la del *CYC1* de *S. cerevisiae*, se ve incrementada en condiciones de falta de aminoácidos en el medio. Como vimos en la figura 26, la diferencia en los niveles de mRNA citocromo *c* de la línea aGHI de *S. cerevisiae*, transformada con pCAF10, en YPG respecto a CM-Trp-Glicerol permitió ver un mayor nivel de expresión para ambos genes en este segundo medio, este resultado se confirma en la figura 30.

El crecimiento en medio con limitación de aminoácidos produce un incremento en los niveles de mRNA tanto de *KICYC1* como de *CYC1*. Sin embargo, este cambio no lleva a los citocromos a expresarse hasta un umbral máximo sino que éstos todavía son susceptibles de inducción por hemo (CMG y CMG+hemina figura 28).



Figura 30. Variación en los niveles de expresión de *KICYC1* en medios ricos y sintéticos con glicerol al 2% 1 aGHI CM-Trp-G; 2 α LRI YPG; 3 aGHI YPG; 4 Y-1140 YPG. Células de *S. cerevisiae* transformadas con pCAF10. Sondas: *KICYC1* fragmento *Pst*I-*Pst*I de pART10, *CYC1* fragmento *Xho*I-*Hind*III de *CYC1*-2.4.

Expresión en los mutantes *rox*:

Las mutaciones *rox* afectan a genes implicados en la regulación por hemo y fuente de carbono (Zitomer y Lowry, 1992). La disponibilidad de las cepas mutantes *rox1*, 4, 5 y 6 nos permitió estudiar el efecto de las mutaciones *rox* sobre el gen *KICYC1*.

Las líneas aGHI y sus correspondientes mutantes *rox1*, *rox4*, *rox5* así como α LR1 y *rox6* fueron transformadas con el plásmido pCAF10 y se realizaron extracciones de RNA total a partir de cultivos en glucosa, glicerol y para el caso de los mutantes *rox1* también en anaerobiosis (figuras 31 y 32).

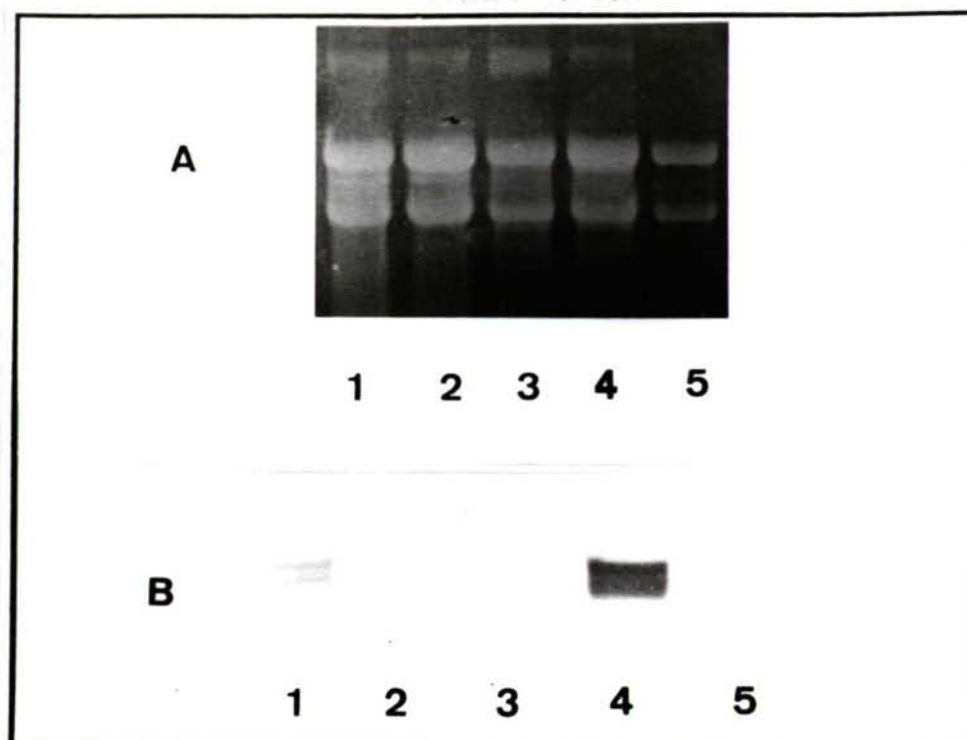


Figura 31. Efecto de las mutaciones *rox* sobre *KICYC1*: Experimento con células creciendo en medio rico, YPG. Células transformadas con pCAF10. 1 *rox1*-O₂; 2 *rox1* +O₂; 3 *rox5*; 4 *rox4*; 5 *rox1*; 6 aGHI. Sonda: *KICYC1* fragmento *Pst*I-*Pst*I de pART10.

La mutación *rox1* no afecta a la expresión de *KICYC1*. No hay grandes diferencias respecto a la línea aGHI en aerobiosis, apreciándose si cabe una débil disminución en la intensidad de la banda (se aprecia una sola banda porque el tiempo de electroforesis en este experimento fué de 3 horas y ambos transcritos no se separaron). En el mutante *rox1* los niveles de RNA mensajero de *KICYC1* en anaerobiosis disminuyen drásticamente, al igual que sucedía para *CYC1* y en contraposición con lo que sucede en *CYC7*; este gen posee un sitio represor al que se une ROX1 evitando su expresión en condiciones aerobias. La mutación *rox1* no afecta al gen *KICYC1* puesto que de ser así veríamos incrementar su mRNA en anaerobiosis.

Las mutaciones *rox4* (*tup1*) y *rox5* (*cyc8*) producen una expresión constitutiva de *KICYC1* (figuras 31 y 32). Se pierde la regulación por fuente de carbono, pero no hay

aumento transcripcional de *KICYC1* como cabría esperar si los correspondientes genes fuesen represores transcripcionales.

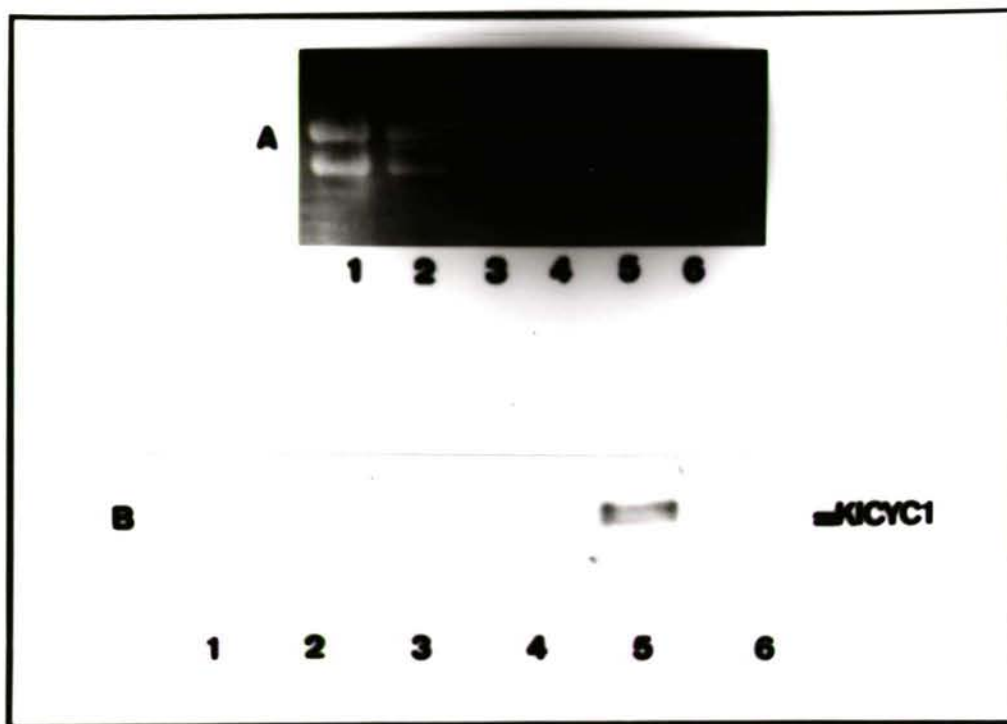


Figura 32. Regulación por fuente de carbono en mutantes *rox4* y *rox5*. Las células, previamente transformadas con pCAF10, crecieron en medio sintético CM-Trp. 1 *rox5* G; 2 *rox5* D; 3 *rox4* G; 4 *rox4* D; 5 aGHI G; 6 aGHI D. D glucosa al 2%; G glicerol al 2%. Sonda: *KICYC1*/fragmento *Pst*I-*Pst*I de pART10.

La mutación *rox6* causa una drástica disminución del *KICYC1* mRNA en glicerol (figura 33), este efecto se ve mas claramente cuando las células crecen en medio carente de Trp. La disminución de RNA mensajero de citocromo *c* se ve acompañada de una disminución en la capacidad de crecimiento, de hecho fué necesario cultivarla en CM-glucosa y mantenerla luego por espacio de dos horas en glicerol.

El hecho de que este efecto sea mas fuerte en medio sin Trp, en donde hemos encontrado previamente un efecto sobre HAP2/3/4, mediado tal vez por *GCN5*, podríamos atribuirlo a algún factor que actuando sobre HAP2/3/4 activaría la unión de este complejo al UAS2 en condiciones normales.

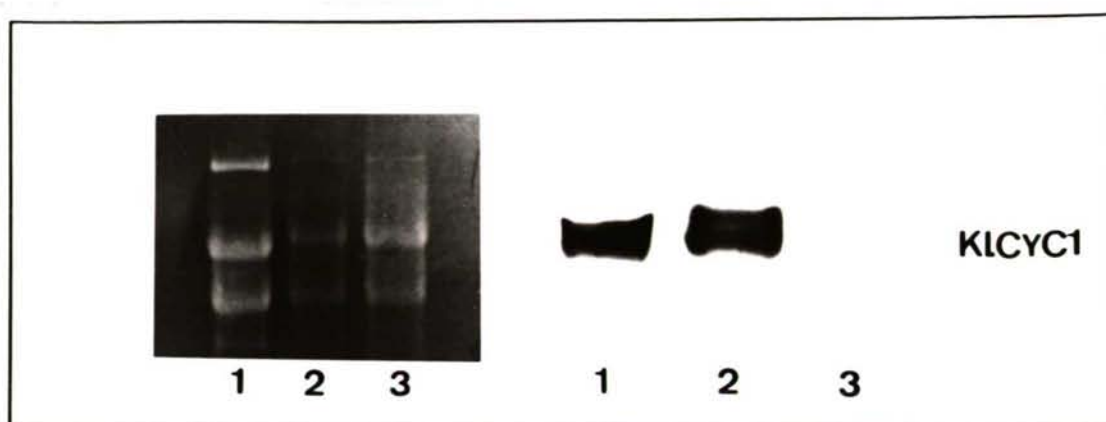


Figura 33. Efecto de la mutación *rox6*. A la izquierda gel de formaldehído teñido tras la electroforesis. A la derecha resultado del Northern blot tras la hibridación. 1 α LRI en CM-Trp-glucosa; 2 *rox6* en CM-Trp-glucosa; 3 *rox6* en CM-Trp-glicerol. Hibridado con las mismas sondas calibradas (*CYC1* y *KICYC1*) de la figura 26.

EXPRESIÓN DEL GEN *KICYC1* EN CEPAS *RAG*⁺ Y *RAG*⁻

Fuentes de carbono fermentables y no fermentables:

Uno de los aspectos de la regulación de la expresión génica que mas interés ha suscitado es el conocer a qué nivel y mediante qué mecanismos se ejerce el papel represor de la glucosa en el proceso de represión catabólica. A este respecto se han estudiado, entre otros, el papel de la captación de glucosa (Bisson *et al.*, 1987, Chen *et al.*, 1992) y de la glucosa fosfato isomerasa (Aguilera y Zimmermann, 1986; Gancedo y Serrano, 1989; Gamo *et al.*, 1993). Hemos estudiado el efecto que las mutaciones de los genes *RAG1* y *RAG2*, que codifican para un transportador de glucosa de baja afinidad y para la glucosa fosfato isomerasa respectivamente, tienen sobre la transcripción del gen *KICYC1* que, como vimos previamente, se encuentra sometido a represión por glucosa.

Se realizaron experimentos de Northern blot a partir de la línea de *K. lactis* MW98-8c (*rag1*, *rag2*) creciendo en glucosa al 0,5% y al 2% así como en glicerol al 2% y en fructosa al 2%. Como se puede apreciar en la figura 34A, no existen grandes diferencias a nivel transcripcional, entre la línea salvaje y el doble mutante *rag1 rag2*, habiendo en ambos casos una menor expresión en glucosa al 2% respecto a glucosa al 0,5%. En la figura 34B se comprueba la menor expresión en glucosa respecto a glicerol al 2%. Estos resultados indican que las mutaciones *rag1* y *rag2* no cambian el patrón de regulación por fuente de carbono de

KICYC1 a nivel transcripcional. En fructosa al 2% se observaron niveles de expresión que se corresponden con los que aparecen en condiciones de represión ver figura 36B.

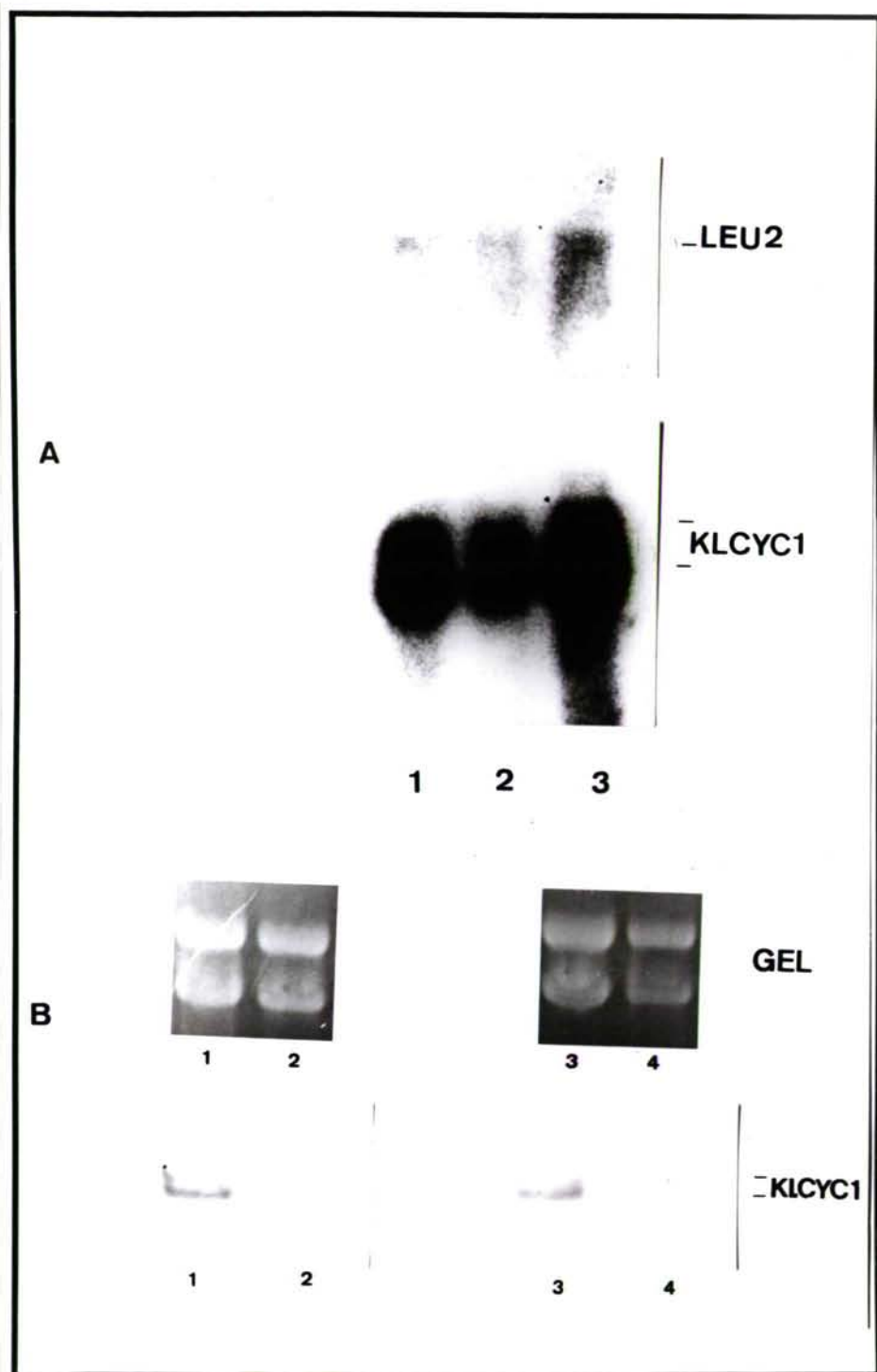


Figura 34. Niveles de RNA mensajero *KICYC1* en cepas *RAG*⁺ y *RAG*⁻. A, 1 MW98-8c glicerol; 2 MW98-8c glucosa; 3 Y1140 glicerol. B: 1 y 2 MW98-8c glucosa al 0,5 y 2% respectivamente. 3 y 4 Y1140 en glucosa al 0,5 y 2%. Sonda: *KICYC1* fragmento *Pst*I-*Pst*I de pART10. Sonda: *LEU2* fragmento *Hind*III-*Hind*III (1,1 Kb) del p smido pAWJ1-1.

Expresión en condiciones aerobiosis-anaerobiosis:

En la cepa MW98-8c (*rag1*, *rag2*) el crecimiento, en condiciones anaerobias es prácticamente nulo (figura 35); esta cepa tiene serias limitaciones fermentativas (Mazzoni *et al.*, 1992) y su crecimiento en aerobiosis se debe fundamentalmente a la respiración.

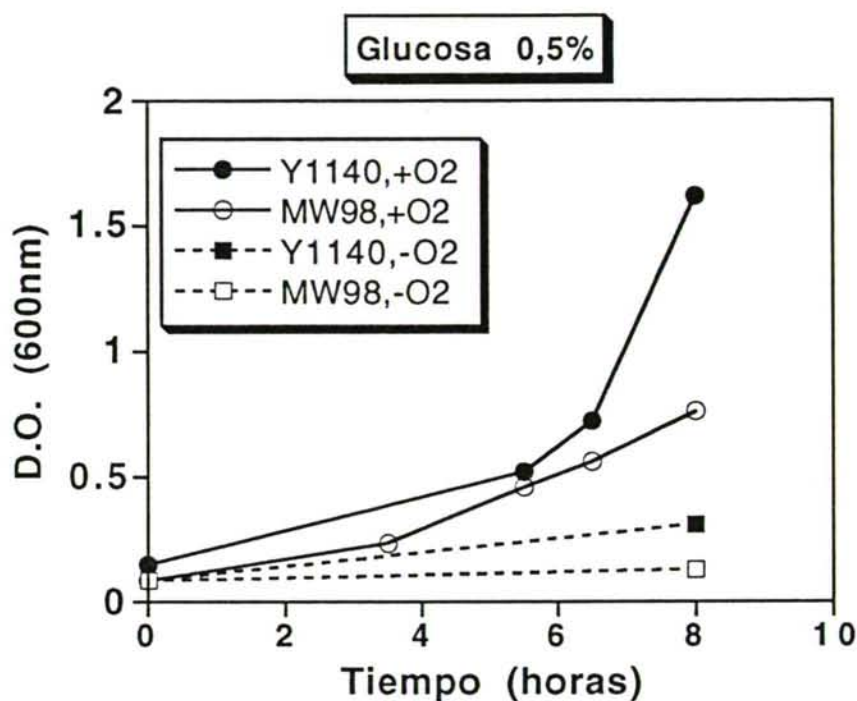
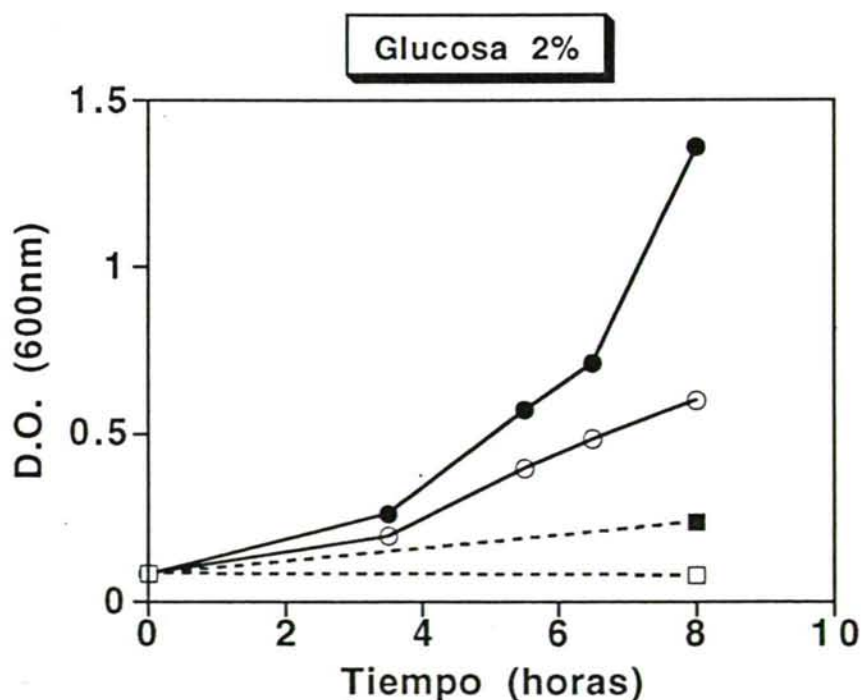
**A****B**

Figura 35. Comparación del crecimiento aerobiosis / anaerobiosis de las líneas Y1140 y MW98-8c en medio fermentable (glucosa al 2 y 0,5%).

En la citada línea mutante para los genes *RAG1* y *RAG2*, los niveles de mRNA del gen *KICYC1* en condiciones anaerobias se mantienen a niveles similares a los encontrados en condiciones aerobias en contraposición a la caída transcripcional que vimos anteriormente para el mRNA de *KICYC1* en la línea salvaje. Este resultado se cumple independientemente de que la concentración de glucosa sea 2% ó 0,5% (figura 36A).

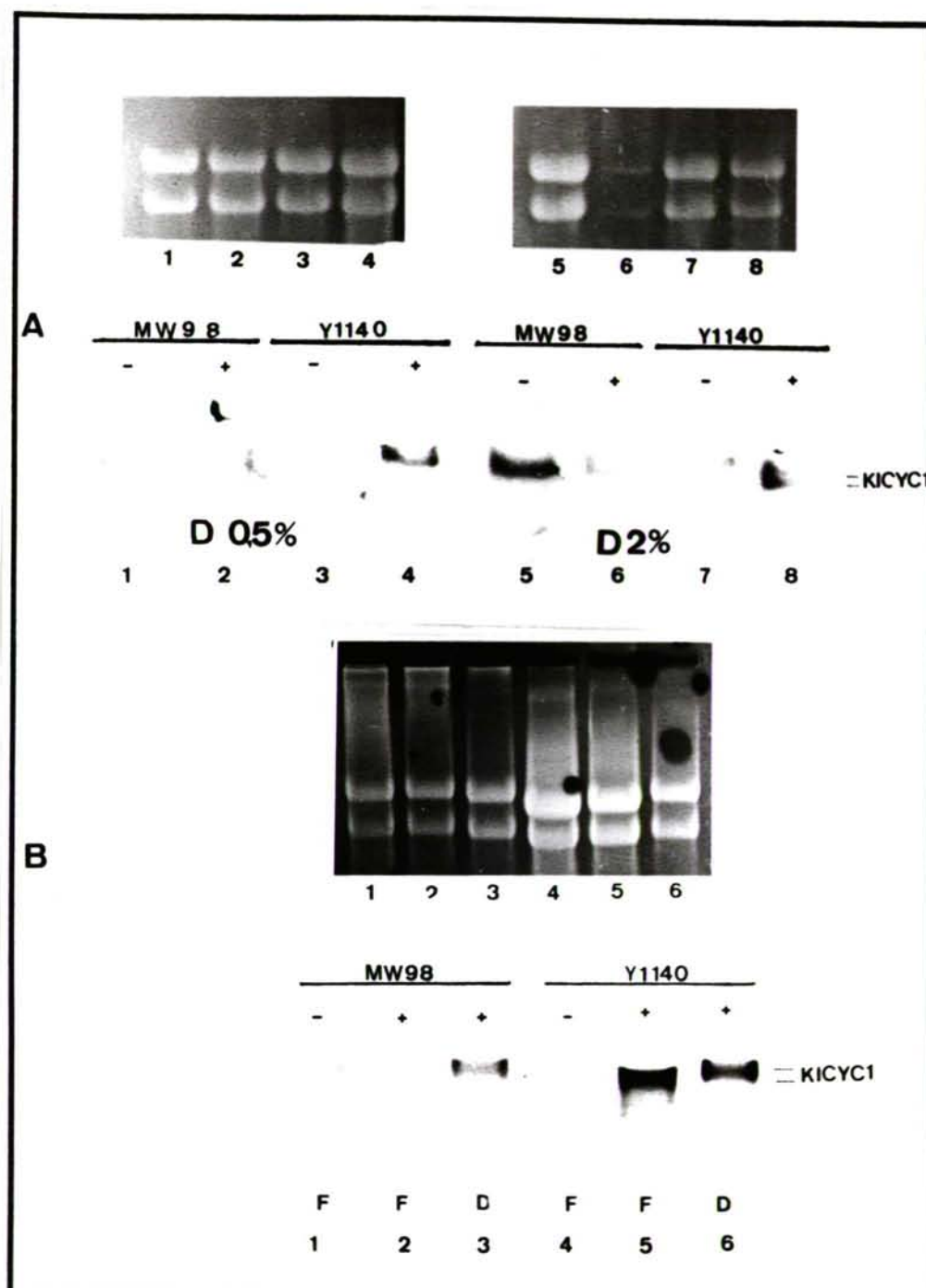


Figura 36. A niveles de mRNA de la línea Y1140 (salvaje) y Mw98-8c (*rag1*⁻, *rag2*⁻) en condiciones aerobias (+) o anaerobias generadas mediante burbujeo con N₂ (-), en glucosa al 0,5% (pocillos 1-4) y glucosa al 2% (pocillos 5-8). B Experimento en fructosa al 2% (pocillos 1,2 y 4,5) glucosa al 2% 3 y 6.

Como la línea MW98-8c es un doble mutante, para evitar el posible efecto de la mutación *rag2*, repetimos el experimento en otro medio fermentable, la fructosa; las diferencias o semejanzas entre los niveles de expresión aerobiosis/anaerobiosis son atribuibles en este caso a la mutación *rag1*, puesto que al crecer en fructosa no se necesita la intervención de la glucosa fosfato isomerasa, que se ve afectada por la mutación *rag2*.

El Northern blot en estas condiciones (Figura 36B) corroboró el resultado inicial, los niveles de mRNA de *KICYC1* se mantienen en anaerobiosis en el mutante MW98-8c, mientras que en la línea salvaje disminuyen y este efecto parece por tanto atribuible a la mutación *rag1*.

Independientemente de que este resultado se deba exclusivamente a la mutación *rag1* o al efecto acumulativo de las dos mutaciones *RAG*, la transcripción de *KICYC1* en condiciones anaerobias se ve afectada por ellas. Es importante constatar que en estas condiciones no hay crecimiento de MW98-8c (figura 35) y que los niveles de mRNA de *KICYC1* no se corresponden con los niveles de oxígeno en el medio. La cepa salvaje, en la que caen drásticamente los niveles de mensajero en condiciones anaerobias, es capaz de crecer en ausencia de oxígeno a expensas de su capacidad fermentativa.

Si los genes *RAG* no hubiesen sido clonados podríamos pensar que *RAG1* es un represor de *KICYC1* en condiciones anaerobias, puesto que su mutación lleva a un incremento transcripcional en anaerobiosis, pero esta hipótesis está descartada; de hecho el único represor para el que se ha descrito una actuación directa sobre la expresión de citocromos es *ROX1*, que actúa como represor de *CYC7* en condiciones aerobias. Esta represión se produce por tanto, ante señales fisiológicas opuestas a las que actúan en el mutante MW98-8c, además, como vimos anteriormente, la mutación *rox1* no afecta a *KICYC1* en la línea salvaje.

Otra posible interpretación es que este efecto sea una respuesta adaptativa a una situación de stress. La respuesta a condiciones de stress, en levaduras implica muchos factores y procesos que en este momento se hallan bajo investigación. Entre las situaciones de stress que se producen en levaduras tenemos como ejemplo el shock térmico, la exposición de las levaduras a elevadas concentraciones de etanol, sales, peróxidos de hidrógeno etc. (Mager y Ferreira, 1993). El factor HSP104, es un ejemplo de factor nuclear necesario para la adquisición de tolerancia a condiciones de stress que se expresa constitutivamente en células que crecen a expensas de la respiración, estas células son mas resistentes a un shock térmico que aquellas que crecen por vías fermentativas. También se ha

descrito su papel en la tolerancia a elevadas concentraciones de etanol (Mager y Ferreira, 1993).

Es posible que la falta de oxígeno, para una célula cuya única posibilidad de obtener la energía que necesita para crecer es la respiración, podría estimular la transcripción de algún factor de respuesta a esta carencia. En una revisión de Forsburg y Guarente (1989a) se comenta la posibilidad (aún por demostrar) de que un factor *Heat-shock* se una a HAP1. De existir este factor en *K. lactis* actuaría probablemente sobre el UAS1 de *KICYC1*, puesto que desde esta región se ejerce la regulación transcripcional por oxígeno. En este sentido Pillar y colaboradores (1991) describieron la activación transcripcional del gen *CYC7* en respuesta a un shock térmico, respuesta que no se produce en *CYC1*.

DISCUSIÓN

Clonación del gen citocromo *c* de la levadura *Kluyveromyces lactis*

En este trabajo se describe la clonación del gen citocromo *c* de la levadura *Kluyveromyces lactis* que ha sido confirmada por una serie de evidencias. En primer lugar el plásmido aislado complementa, tanto en monocopia como multicopia, la mutación *CYC*⁻ de *S. cerevisiae* permitiendo a las cepas deficientes en ambos citocromos (*CYC1* y *CYC7*) crecer en glicerol y lactato. En segundo lugar *KICYC1* hibrida con *CYC1* de *S. cerevisiae*, tanto en Southern plasmídicos como genómicos (figuras 10 y 11), coincidiendo las bandas de hibridación con los tamaños esperados según el patrón de restricción del DNA clonado (figura 9). Una tercera evidencia proviene del análisis de su secuencia; esta contiene una pauta de lectura abierta de 330 pb con una homología del 70 al 80% con otros citocromos de levaduras (figuras 13 y 14, tabla II). La proteína citocromo *c* codificada por *K. lactis* contiene los aminoácidos esenciales para su función que se encuentran altamente conservados entre especies.

Análisis del uso de codones en *K. lactis* y genes citocromo *c* de levaduras

Ikemura en 1985 al analizar los codones que utilizaban diferentes genes, describió a *CYC1* y *CYC7* como genes de baja expresión y con bajo *bias* en el uso de codones. El análisis del uso de codones, en los genes citocromo *c* de *K. lactis* (tablas III IV y V) y de otras levaduras (tablas VI y VII) revela que los genes citocromo *c* de aquellas levaduras clasificadas como respiradoras aerobias presentan un *bias* mayor que los de las levaduras predominantemente fermentadoras. Experimentos de Northern blot mostraron que los niveles de RNA mensajero de *KICYC1* son mayores que los de *CYC1* de *S. cerevisiae* (figura 26), lo que confirma la correlación existente entre alto *bias* y alto nivel de expresión génica.

Ahora bien, los resultados obtenidos no permiten conocer si la utilización de codones preferentes en *K. lactis* es una estrategia para una traducción mas eficiente de un gen que se expresa a altos niveles, bajo el control de factores transcripcionales específicos; o bien, si reflejan una mayor estabilidad de un mensajero que utiliza codones preferentes.

Carecemos de datos directos sobre la eficacia de la traducción en *K. lactis*; cabe comentar que la secuencia consenso alrededor del codón de inicio no coincide con la propuesta para eucariotas superiores ni para genes de levaduras, AAAAAAAUGUCU

(Laz *et al.*, 1987; Clements *et al.*, 1989). Sin embargo, aunque en *KICYC1* no existe esta secuencia, sí existe una A en posición -3 respecto al AUG (figura 15); la existencia de A en la citada posición parece influir en la eficiencia de la traducción (Romanos *et al.*, 1992).

Regulación transcripcional de *KICYC1*

La existencia de dos mensajeros de distinto tamaño (figuras 19, 20 y siguientes), atribuida según nuestros resultados a la existencia de dos puntos distintos terminación, es una clara diferencia con otros genes citocromo *c* de levaduras como *CYC1* y *CYC7* de *S. cerevisiae* o *CYCo* *S. occidentalis*.

En cualquier caso podemos afirmar que las señales de terminación de *KICYC1* son reconocidas en *S. cerevisiae* puesto que el tamaño de los transcritos de *KICYC1* se mantienen en los experimentos de expresión heteróloga realizados en *S. cerevisiae* (figura 26 y siguientes). Producir mensajeros de mayor tamaño podría representar una ventaja transcripcional al permitir la formación de estructuras secundarias en el extremo 3' (de hecho existen secuencias que pueden formar horquillas) impidiendo su degradación. En este sentido y en contra de esta idea, parece existir, al menos en levaduras, una correlación inversa entre la longitud y la estabilidad del mRNA (Brown, 1989).

Regulación por oxígeno

El análisis de la región 5' nos permitió encontrar homologías con secuencias consenso para la unión de factores transcripcionales que operan sobre otros genes citocromo *c* (figuras 15 y 16). Más concretamente con los sitios de unión de HAP1 y el complejo HAP2/3/4. Al estudiar la expresión de *KICYC1* bajo diferentes condiciones pudimos comprobar que, al igual que los genes citocromo *c* de *S. cerevisiae* y *Schwanniomyces occidentalis*, *KICYC1* está sometido a regulación por oxígeno, puesto que se expresa predominantemente en condiciones aerobias y en anaerobiosis decaen los niveles de mRNA (figura 23). La adición de hemina al medio de cultivo produce la activación transcripcional de *KICYC1* tanto en condiciones aerobias como anaerobias, indicando que el grupo hemo actúa como intermediario en la transmisión de la señal. Los experimentos de expresión heteróloga en las líneas de *S. cerevisiae* ZW10 y LPY22 (figuras 27 y 28) mutantes para el factor regulador HAP1 indican que HAP1 es capaz de activar la transcripción de *KICYC1* y que posiblemente existe, en *K. lactis*, un factor regulador homólogo implicado en la regulación por oxígeno.

Regulación por la fuente de carbono:

Los niveles de expresión del gen clonado en fuentes de carbono fermentables, como la glucosa o la fructosa y no fermentables, como el glicerol o la rafinosa, indicaron la existencia de represión por glucosa que se traduce en una disminución de 1,5 a 2,5 veces en los niveles de mensajero en presencia de glucosa. Si bien el grado de represión no es muy elevado, la regulación de *KICYC1* de *S. cerevisiae* es más semejante a *CYC1* que a *CYCo* de *Schwanniomyces occidentalis* que no está regulado por la fuente de carbono (Amegadzie *et al.*, 1990). La baja represión por glucosa de *KICYC1* no es un fenómeno único en su especie; el grado de represión por glucosa de los genes *LAC* de *K. lactis* es menor que el de sus homólogos en *S. cerevisiae* (Dickson y Riley, 1989). La fructosa-1,6-bifosfatasa de *K. lactis* también presenta menor grado de represión por glucosa que su homóloga en *S. cerevisiae* (Zaror *et al.*, 1993). Parece por tanto que en general el efecto de la glucosa sobre la transcripción de genes relacionados con funciones glicolíticas y respiratorias es menor en esta especie.

Según proponen Amegadzie y colaboradores (1990), en las cepas con poca tolerancia al etanol, como es el caso de *S. occidentalis*, pueden ser necesarios elevados niveles de las proteínas respiratorias para evitar que, durante el crecimiento sobre azúcares, se produzca la acumulación de etanol. Se podría pensar que el menor grado de represión por glucosa en *K. lactis*, al menos en la línea Y1140, se deba a una menor tolerancia al etanol que *S. cerevisiae*. Datos de nuestro laboratorio (Comunicación personal de I. González) indican que las cepas Y1140 de *K. lactis* y α LRI de *S. cerevisiae* producen cantidades similares de etanol cuando crecen en glucosa al 2%. Es muy posible que al cambiar de cepas se encuentren diferencias, sobre todo si se utilizan líneas de *S. cerevisiae* de alta producción de etanol (Mazzoni *et al.*, 1992), pero a nivel de laboratorio y con dos cepas salvajes, tales diferencias no existen.

El efecto Crabtree en K. lactis

El efecto Crabtree se define de dos formas: la producción de etanol en condiciones aerobias y la represión de la respiración por la glicolisis (revisión de Alexander y Jeffries, 1990). Según estos autores las levaduras Crabtree positivas tienen necesariamente limitada su respiración, son *petite* positivas y capaces de crecer en anaerobiosis, en estas especies la respiración es opcional.

Considerando el *efecto Crabtree* desde el punto de vista clásico, vemos que en condiciones aerobias hay producción de etanol simultáneamente con la respiración por lo que podemos decir que *K. lactis* es *Crabtree* positiva porque:

- Produce etanol en aerobiosis (Mazzoni *et al.*, 1992, Chen y Clark-Walker 1993., datos de nuestro laboratorio).

- Es capaz de crecer en anaerobiosis a expensas de su capacidad fermentadora (figuras 21 y 22). Es posible que más que una incapacidad de *Kluyveromyces* para fermentar se trate de una mejor capacidad respiratoria en esta levadura, lo que le llevaría a depender en mayor grado de la respiración para obtener energía en condiciones aerobias.

Sin embargo, no encaja en los requisitos necesarios según Alexander y Jeffries porque no tiene la limitación respiratoria de *S. cerevisiae*; *K. lactis* crece mejor en medios no fermentables que *S. cerevisiae*. El crecimiento en glicerol fué siempre mayor en *K. lactis* que en cualquiera de las dos cepas salvajes de *S. cerevisiae* utilizadas (α LRI y aGHI) y esta diferencia fué mucho mas acusada en medios sintéticos. Este dato apoya la idea de la menor capacidad respiratoria de *Saccharomyces*, previamente ya apuntado por Barford y Hall (1981).

- Diversos autores correlacionan la mutación *petite* con el *efecto Crabtree* (De Deken, 1966b; Alexander y Jeffries, 1991) éstos últimos autores comentan que la mutación *petite* es letal para aquellas levaduras que son incapaces de crecer en ausencia de oxígeno. *K. lactis* es *petite* negativa; sin embargo, recientemente se ha demostrado que la incapacidad para producir mutaciones *petite* se debe a la presencia de los genes MGI y no a una incapacidad fermentadora. Chen y Clark-Walker (1993) mostraron que mutaciones en este gen convierten la levadura en *petite* positiva y nosotros hemos comprobado que *K. lactis* es capaz de crecer, aunque más lentamente, en condiciones anaerobias.

- El gen citocromo *c* de *K. lactis* al igual que otros previamente caracterizados, está sometido a represión por glucosa (figura 23), si bien sus niveles de represión son menores que los de *S. cerevisiae*.

Se ha descrito que la tasa de respiración de la cepa de *K. lactis* CBS-2359 (Y1140) no varía en fase estacionaria temprana en cultivos creciendo a diferentes concentraciones de glucosa (Ferrero *et al.*, 1978). En función de este resultado Goffrini y

colaboradores en 1991 comentan que no existe represión por glucosa para las funciones respiratorias, lo cual englobaría a la expresión de citocromo *c*. Este dato que está en desacuerdo con nuestros resultados, puesto que ya hemos visto la existencia de represión catabólica, podría indicar la existencia adicional de mecanismos de regulación post-transcripcional.

Regulación por HAP2 de S. cerevisiae

Experimentos de expresión heteróloga de *KICYC1* en el mutante JO1-1a de *S. cerevisiae* (figura 28) indicaron que la mutación en *HAP2* lleva a la falta de crecimiento en glicerol de las líneas de *S. cerevisiae* transformadas con el clon. La activación a través del UAS2 es muy impotente en el gen *CYC1* de *S. cerevisiae* y la mutación de *HAP2* que hace que tampoco se produzca la activación de *KICYC1* a través del UAS2 de su promotor. Dado que *HAP2* posee sólo un dominio de unión al DNA pero carece de dominio de activación, el complejo HAP2/3/4, ha de ser el verdadero responsable de ella. Esto a su vez sugiere que en el promotor de *K. lactis*, la secuencia homóloga al UAS2 está implicada en la activación transcripcional a través de un complejo similar; de hecho los factores homólogos a *HAP2* y *HAP3* de *K. lactis* ya han sido clonados (M. Bolotin-Fukuhara y su equipo clonaron *KIHAP2* mientras que Grivel y colaboradores clonaron *KIHAP3*).

La conservación de factores transcripcionales en eucariotas se cumple también entre *K. lactis* y *S. cerevisiae*, los factores *HAP1* y *HAP2* de esta última levadura, son capaces de regular específicamente la transcripción del gen *KICYC1*, en respuesta a las mismas señales fisiológicas que les llevan a producir la activación transcripcional de *CYC1*.

La mayor expresión del gen *KICYC1* respecto a *CYC1*, en *S. cerevisiae* nos llevó a analizar si alguno de los cambios en la secuencia promotora coincidía con alguna de las mutaciones previamente descritas que incrementan la activación a través del UAS2; este es el caso de la mutación UP1 que convierte la secuencia CCAAC en CCAAT, aumentando 10 veces la actividad del UAS2 (Olesen *et al.*, 1987). En *K. lactis* la secuencia existente es CCAAA (figuras 15 y 16); esta secuencia difiere de las descritas previamente, no sabemos si realmente produce mayor "actividad del UAS2" o si son las secuencias adyacentes las que pueden facilitar una transcripción más eficiente.

Hemo como señal reguladora

El grupo hemo es una de las señales que median la relación núcleo-mitocondrias señalando los niveles de oxígeno (Forsburg y Guarente, 1989a). En *K. lactis* la adición de hemina conduce a la activación transcripcional de citocromo *c* en células creciendo en anaerobiosis, independientemente de la fuente de carbono; esta adición produce también un incremento de los niveles de mensajero en condiciones aerobias. Por otro lado, en los mutantes para los genes *HAP1* y *HAP2* de *S. cerevisiae*, pudimos comprobar que hemo actúa, tanto a través de *HAP1* como del complejo *HAP2/3/4*, activando la transcripción de *KICYC1* (figuras 26 y 28).

Efecto de la carencia de aminoácidos sobre la expresión de citocromo *c*:

Las levaduras se adaptan a las limitaciones de aminoácidos incrementando los niveles de transcripción de los genes que codifican para enzimas de la biosíntesis de aminoácidos. En estas condiciones se ve activada la transcripción del mRNA de *GCN4* (Hope y Struhl, 1985), activador transcripcional para la biosíntesis de aminoácidos, mientras que la tasa total de síntesis de proteínas se ve reducida. La activación transcripcional mediada por *GCN4* requiere a su vez la función de la proteína *GCN5* (Georgakopoulos y Thireos, 1992). Se piensa que ésta proteína está relacionada con la capacidad de *GCN4* para acceder a su diana y que *GCN5* afecta a la estructura de la cromatina. Los mutantes *gcn5* presentan un crecimiento muy reducido en fuentes de carbono no fermentables y con carencia de aminoácidos. *GCN5* es también necesaria para que se produzca la máxima activación transcripcional de los genes implicados en funciones respiratorias mediadas por el complejo *HAP2/3/4* (Georgakopoulos y Thireos, 1992).

En este trabajo hemos comprobado que la carencia de aminoácidos en el medio produce una activación transcripcional tanto de *CYC1* de *S. cerevisiae* como de *KICYC1* cuando se expresa en esta levadura (figuras 26 y 30) sin embargo, esta situación no lleva a los genes *KICYC1* y *CYC1* a alcanzar el máximo nivel de expresión, sino que todavía es posible la inducción por hemo (figura 28); seguramente esta inducción se produce tanto a través del *UAS1* como del *UAS2* según se puede apreciar en los experimentos de expresión heteróloga de *KICYC1* en mutantes para *HAP1* y *HAP2*.

Efecto de las mutaciones *rox* sobre la expresión de *KICYC1*

El estudio de la regulación de *KICYC1* en los mutantes para el gen *ROX1* (figura 31) nos permitió comprobar que este factor encargado de la represión hemo-dependiente no actúa como represor de *KICYC1* en condiciones aerobias; esta mutación tampoco afecta al gen *CYC1* de *S. cerevisiae*.

El gen *ROX4*, alélico de *TUP1* y *AER2* (Zang *et al.*, 1991), está implicado en la represión catabólica de *CYC1* y de los genes *SUC*, para esta actividad reguladora se encuentra asociado al factor *CYC8(SSN6)* (Zang *et al.*, 1991; Trumbly, 1992; Zitomer y Lowry, 1992); *ROX4* está también implicado en la activación de *ROX1* para la represión de *CYC7* (Lowry y Zitomer, 1992). El efecto de las mutaciones *rox5* ha sido caracterizado en *CYC1* y *CYC7* de *S. cerevisiae*; se sabe que produce un aumento en la expresión de *CYC7* en anerobiosis, produce además células floculantes y parece ser alélico de *SSN6* (comunicación personal de R. Zitomer). Los resultados obtenidos al estudiar la expresión de *KICYC1* en los mutantes *rox4* y *rox5* de *S. cerevisiae*, en comparación con la línea salvaje (figuras 31 y 32) no permiten otorgar a estos factores un papel regulador sobre *KICYC1*. Es posible que si actúan reprimiendo la acción activadora del complejo HAP2/3/4 su débil acción sea la responsable de la débil represión por glucosa de *KICYC1*.

Más interesante resulta el efecto de la mutación *rox6* (figura 33), todavía no bien caracterizada en *S. cerevisiae*. La expresión de *KICYC1* así como la de *CYC1*, cuando las células *rox6* crecen en medio sintético con glicerol disminuye. Sin embargo, esta disminución no se produce en medio sintético con glucosa. Los cultivos se hicieron en medio CM-Trp y en estas condiciones la cepa *rox6 (trp⁻)* necesita la biosíntesis de éste aminoácido para el crecimiento. Ello nos hace pensar en la posibilidad de que el producto del gen afectado por esta mutación desempeñe algún papel regulador en condiciones de biosíntesis de aminoácidos; el hecho de que este efecto se acuse en fuentes de carbono no fermentables nos hace pensar que su acción probablemente se ejerza a través del complejo HAP2/3/4.

En medios con glicerol como fuente de carbono, los mutantes *rox6* son incapaces de adaptarse a la limitación de algún aminoácido y se produce en ellas una drástica disminución de citocromos (*CYC1* y *KICYC1*) (figura 33). Tal vez el gen *ROX6* codifique para algún factor implicado en la activación transcripcional cuando en las células predomina un metabolismo respiratorio y se ven sometidas a carencia de algún aminoácido. Una futura clonación del gen *ROX6* nos permitirá aclarar este punto que por el momento no pasa de ser una hipótesis abierta a la comprobación y estudio.

Expresión de *KICYC1* en mutantes *RAG*.

El estudio de las mutaciones *rag* de *K. lactis*, en las que se necesita una respiración activa para el crecimiento celular en presencia de glucosa, puso de manifiesto la relación existente entre la respiración y la fermentación (Goffrini *et al.*, 1989). Esta dependencia resultó ser mas crítica en los mutantes cuyo citocromo *c* había sido previamente interrumpido con el marcador URA estos dobles mutantes (*rag⁻*, *cyc1⁻*) son incapaces de crecer en glucosa y el efecto de la disrupción es mas drástico que el tratamiento con antimicina A. (Chen y Clark-Walker, 1993).

Realizamos el estudio de la regulación del gen *KICYC1* en la cepa MW98-8c de *K. lactis* con el propósito de ver el efecto de estas mutaciones sobre la represión catabólica en *KICYC1*; como ya se ha expuesto, el doble mutante (*rag1*, *rag2*) cuyo crecimiento depende exclusivamente de la respiración (Goffrini *et al.*, 1991) mantiene la represión por glucosa de su citocromo (figura 35). Parece por tanto que ni el transportador de glucosa ni la glucosa fosfato isomerasa tienen un papel crítico en la represión por glucosa de los citocromos.

Curiosamente al estudiar los niveles de expresión de *KICYC1* en la línea MW98-8c en condiciones anaerobias encontramos que, de modo opuesto a lo que sucede en la cepa salvaje, los niveles de mRNA no disminuyen, aunque sin embargo, no hay crecimiento celular (figuras 34 y 36). Dada la importancia que la respiración tiene en éstas líneas pensamos que el efecto observado se debe a una activación atípica de la transcripción en respuesta a una situación extrema para la que las células no tienen mecanismo alternativo de regulación.

Entre las hipótesis que podrían explicar ésta regulación pensamos que en estas condiciones (mutante *rag⁻*, anaerobiosis) podría estimularse la unión de HAP1 en ausencia de hemo. En este sentido HAP1 es capaz de activar la transcripción (aunque no se sabe si directa o indirectamente) de *HEM13* en ausencia de hemo y en anaerobiosis (Verdiere *et al.*, 1991; Zitomer y Lowry, 1992). También podría tratarse de un factor de stress que respondiese a la falta de oxígeno y que actuase directamente sobre el promotor de *KICYC1* o afectase a sus factores reguladores habituales. La posibilidad de que algún factor tipo *heat-shock* se una a HAP1 produciendo activación transcripcional a través del UAS1 ya ha sido previamente señalada (Forsburg y Guarente, 1989a).

En la figura 37 se muestra el modelo de regulación para el gen *KICYC1* basado en los resultados de este trabajo y las deducciones apartir de la secuencia de la región promotora.

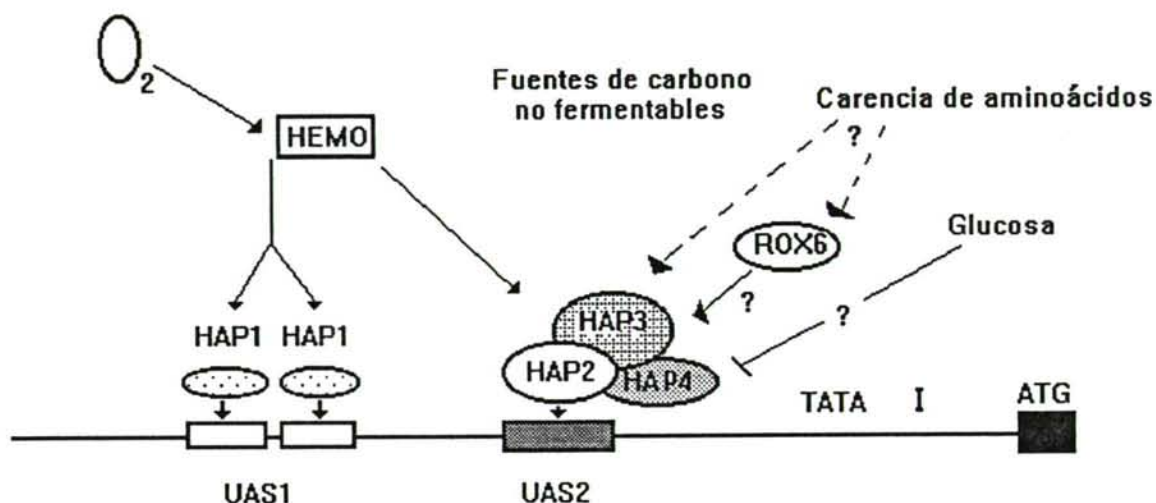


Figura 37. Modelo de regulación de *KICYC1*.

Como hemos descrito, la regulación de la expresión del gen *KICYC1* de *K. lactis*, si bien responde a las mismas señales del medio, hemo y fuente de carbono, que el gen *CYC1* de *S. cerevisiae*, presenta diferencias respecto a los niveles de expresión, uso de codones y señales de terminación, que parecen estar en consonancia con las diferencias metabólicas existentes entre ambas levaduras. Posteriores estudios tanto de su región promotora como de la secuencia 3', nos ayudarán a conocer la razón de tales diferencias en la regulación, así como a comprender mejor los mecanismos que regulan la expresión génica en eucariotas. Los mayores niveles de expresión de *KICYC1* pueden resultar útiles para facilitar el estudio de los factores reguladores que actúan sobre los genes de citocromos.

Desde que en los años 60 Fred Sherman comenzó el estudio de los genes citocromo *c* de levaduras, tanto la proteína como el gen que la codifica han sido objeto de numerosos e interesantes estudios. Esperamos que este trabajo constituya una nueva aportación al conocimiento de los citocromos y su regulación.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

-. Hemos clonado por complementación en una línea de *S. cerevisiae* deficiente en citocromos el gen *KICYC1* que codifica para una proteína citocromo *c* de la levadura *Kluyveromyces lactis*. Los análisis de Southern blot indican que hibrida con el *CYC1* de *S. cerevisiae*.

-. Una vez secuenciado el gen comprobamos que *KICYC1* contiene una ORF de 330 nucleótidos que codifica para una proteína con todos los requerimientos estructurales de un citocromo. Del análisis de esta secuencia se deduce también que tiene una gran homología con otros citocromos de levaduras.

-. El gen citocromo *c* de *K. lactis* tiene un *bias* en el uso de codones más alto que el de los genes *CYC1* y *CYC7* de *S. cerevisiae*, lo que se correlaciona además con un mayor nivel de expresión.

-. El gen *KICYC1* genera dos transcritos que se encuentran sometidos a un doble control transcripcional:

a) una regulación por oxígeno, puesta en evidencia por la disminución de los mensajeros en condiciones anaerobias así como por su respuesta a hemo. Hemo actúa como señal activando la transcripción de *KICYC1* independientemente de la fuente de carbono.

b) represión por glucosa.

-. Los experimentos de expresión heteróloga permitieron demostrar que:

1.- Los factores HAP1 y HAP2 de *S. cerevisiae* ejercen una acción reguladora sobre el promotor de *KICYC1*.

2.- *KICYC1* no está sometido a represión por *ROX1* lo mismo que sucede con *CYC1* en *S. cerevisiae*.

3.- Las mutaciones *rox4 (tup1)* y *rox5 (ssn6)* no tienen un efecto importante sobre la expresión de *KICYC1*.

4.- La mutación *rox6* afecta drásticamente a la expresión de *KICYC1* disminuyendo sus niveles de RNA mensajero en glicerol.

5.- Los niveles de RNA mensajero, tanto del gen *CYC1* de *S. cerevisiae* como de *KICYC1*, aumentan en medios con carencias de aminoácidos.

6.- Las mutaciones *rag1* y *rag2* no afectan a la represión por glucosa de *KICYC1*. La ausencia de crecimiento en anaerobiosis del doble mutante muestra de nuevo la importancia de una respiración eficiente en estos mutantes incapaces de fermentar. Los niveles de mRNA en el doble mutante *rag1* y *rag2* no disminuyen en condiciones anaerobias.

BIBLIOGRAFÍA

- Abastado, J.P., Miller, P.F., Jackson, B.M. and Hinnebusch, A.G. (1991). "Suppression of ribosomal reinitiation at upstream ORFs in amino acid-starved cells forms the basis for *GCN4* translational control".
Mol. Cell. Biol. **11**: 486-96.
- Aguilera, A. and Zimmerman, F.K. (1986). "Isolation and Molecular analysis of the phosphoglucose isomerase structural gene of *Saccharomyces cerevisiae*".
Mol. Gen. Genet. **202**: 83-89.
- Alexander, M.A. and Jeffries, T.W. (1990). "Respiratory efficiency and metabolite partitioning as regulatory phenomena in yeasts".
Enzyme Microb. Technol. **12**: 2-19.
- Alwine, J.C., Kemp, D.J. and Stark, G.R. (1977). "Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **74**: 5350.
- Amegadzie, B.Y., Zitomer, R.S. and Hollenberg, C.P. (1990). "Characterization of the cytochrome *c* gene from the starch-fermenting yeast *Schwanniomyces occidentalis* and its expression in baker's yeast".
Yeast **6**: 429-440.
- Anderson, S.G. and Kurtland C.G. (1990). "Codon preferences in free-living microorganisms".
Microbiol. Rev. **54**: 198-210.
- Arcangioli, B. and Lescure, B. (1985). "Identification of proteins involved in regulation of yeast iso-1-cytochrome *c* expression by oxygen".
EMBO J. **4**: 2627-2633.
- Baim, S.B., Pietras, D.F., Eustice, D.C. and Sherman, F. (1984). "A mutation allowing an mRNA secondary structure diminishes translation of *Saccharomyces cerevisiae* iso-1-cytochrome *c*".
Mol. Cell. Biol. **5**: 1839-1846.
- Barford, J.D. and Hall, B.D. (1981). "A mathematical model for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* with saturated respiratory capacity".
Biotechnol. Bioeng. **23**: 1735-1762.
- Bennetzen, J.L. and Hall, B.D. (1982a). "The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for Alcohol Dehydrogenase I".
J. Biol. Chem. **257**: 3018-3025.
- Bennetzen, J. L. and Hall, B. D. (1982b). "Codon selection in yeast".
J. Biol. Chem **257**: 3026-3031.

- Bergkamp-Steffens, G.K., Hoeckstra, R. and Planta, R.J. (1992). "Structural and putative regulatory sequences of *Kluyveromyces* ribosomal protein genes".
Yeast **8**: 903-922.
- Bianchi, M.M., Frontali, L. and Fukuhara, H. (1989). "Active recombination of pKD1 in *Kluyveromyces lactis* transformation".
Curr. Genet. **15**: 253-260.
- Bisson, L.F., Neigeborn, L., Carlson, M. and Fraenkel, D.G. (1987). "The *SNF3* gene is required for high affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*".
J. Bacteriol. **169**: 1656-1662.
- Bolivar, F. and Backman K. (1979). "Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors".
Methods Enzymol. **68**: 245.
- Botstein, D., Falco, S.C., Stewart, S.E., Brennan, M., Scherer, S., Stinchomb, D.T., Struhl, K. and Davis, R.W. (1979). "Sterile host yeast (SHY): A eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments".
Gene **8**: 17-24.
- Breunig, K.D. (1989). "Glucose repression of *LAC* gene expression in yeast is mediated by the transcriptional activator *LAC9*".
Mol. Gen. Genet. **216**: 422-427.
- Britten R.J and Davidson (1987). "Hybridisation strategy". En "Nucleic acid hybridisation, a practical approach". Ed. Hames B.D. & Higgings, S.J. IRL Press. Oxford. Págs 3-14
- Brown, A.J.P. (1988). "Messenger RNA stability in yeast".
Yeast **5**: 239-257.
- Bulder, C.J. (1964). "Induction of petite mutation and inhibition of synthesis of respiratory enzymes in various yeast".
Antoine van Leeuwehoek J. Microbiol. Serol. **30**: 1-9.
- Chang, Y-D. and Dickson, R.C. (1988). "Primary structure of the lactose permease gene from the yeast *Kluyveromyces lactis*".
J. Biol. Chem. **263**: 16696-16703.
- Chen, X.J., Wésolowski-Louvel, M. and Fukuhara, H. (1992). "Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. II Transcriptional regulation of the glucose transporter gene *RAG1*".
Mol. Gen. Genet. **233**: 97-105.
- Chen, X.J. and Clark-Walker, D. (1993). "Mutations in *MGI* genes convert *Kluyveromyces lactis* into a petite-positive yeast".
Genetics **133**: 517-525.

- Chodosh, L.A., Olesen, J.T., Hahn, S., Baldwin, A.S., Guarente, L. and Sharp, P.A. (1988). "A yeast and human CCAAT binding protein have heterologous subunits that are functionally interchangeable".
Cell 53: 25-35.
- Cerdán M.E. and Zitomer R.S. (1988). "Oxygen Dependent Upstream Activation sites of *S. cerevisiae* cytochrome *c* genes are related forms of the same sequence".
Mol. Cell. Biol. 8: 2275-2279.
- Cessay, K.J., Bergman, L.W. and Tuck, M. (1991). "Further investigations regarding the role of trimethyllysine for cytochrome *c* uptake into mitochondria".
Int. J. Biochem. 23: 761-768.
- Clark-Walker, G.D. and Miklos G.L.G. (1974). "Mitochondrial genetics, circular DNA and the mechanism of the petite mutation in Yeast".
Genet. Res. 24: 43-57.
- Clark-Walker, G. D. (1991). "Contrasting mutation rates in mitochondrial and nuclear genes of yeasts versus mammals".
Curr. Genet. 6: 195-198.
- Clements, J.M., Laz T. and Sherman, F. (1989). "The role of yeast mRNA sequences and structures in translation". En "Yeast genetic engineering". Ed. P. Barr, A. Brake, and Valenzuela, P. Butterworths publishers. Boston. Págs.65-82.
- Collins, J.F. and Coulson A.F.W. (1987). En "Nucleic acid and protein sequence analysis a practical approach". Ed. Bishop, M.J. and Rawlings, C.J. IRL Press Limited. Oxford. Págs 323-385.
- Cormack, B.P., Strubin, M., Ponticelli, A.S., and Struhl, K. (1991). "Functional differences between yeast and Human TFIID are located to the highly conserved region".
Cell 65: 341-348.
- Crabtree, H.G. (1929). "Observations on the carbohydrate metabolism of tumors".
Biochem. J. 23: 536-545.
- Cruesot, F., Verdiere, J., Gaisne, M. and Slonimski, P.P. (1988). "The *CYP1* (*HAP1*) regulator of oxygen dependent gene expression in yeast. 1: Overall organization of the protein displays several novel motifs".
J. Mol. Biol. 204: 263-276.
- De Mot, R.E., Van Oudendijck and Verachtert, H. (1984). "Production of extracellular debranching activity by amylolytic yeast".
Biotechnol. Lett. 6: 581-586.
- De Deken, B.R.H. (1966a) "The Crabtree effect: a regulatory system in yeast".
J. Gen. Microbiol. 44: 149-156.

- De Deken, B.R.H. (1966b). "The Crabtree effect and its relation to the petite mutation".
J. Gen. Microbiol. **44**: 157-165.
- Deshler, J.O., Larson, G.P. and Rossi, J.J. (1989). "*Kluyveromyces lactis* maintains *Saccharomyces cerevisiae* intron-encoded splicing signals".
Mol. Cell. Biol. **9**: 2208-2213.
- Dickson, R.C. and Riley, M. (1989). "The lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis*". En "Yeast genetic engineering". Ed. P. Barr, A. Brake and Valenzuela, P. Butterworths publishers. Boston. Págs. 65-82.
- Dickson, R.C., Hopper, J., Mylin, L. and Gerardot, C.J. (1991). "Sequence conservation in the *Saccharomyces* and *Kluyveromyces GALII* transcription activators suggest functional domains".
Nucleic Acids Res. **19**: 5345-5350.
- Dumont, M.D., Mathews, A.J., Nall, B.T., Baim, S.B., Eustice, D.C. and Sherman, F. (1990). "Different stability of two apo-isocytochromes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*".
J. Biol. Chem. **265**: 2733-2739.
- Dumont, M.E., Cardillo, T.S., Hayes, M.K. and Sherman, F. (1991). "Role of cytochrome *c* heme lyase in mitochondrial import and accumulation of cytochrome *c* in *Saccharomyces cerevisiae*".
Mol. Cell. Biol. **11**: 5487-5496.
- Entian, K.D. and Barnett, J.A. (1992). "Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*".
TIBS **17**: 506-510.
- Favorolo, J., Treisman, R. and Kamen, R. (1980). "Transcription maps of polyoma virus-specific RNA: Analysis by two-dimensional nuclease S1 gel mapping".
Methods Enzymol. **65**: 718-749.
- Faye, G., Fukuhara, H., Gandchamp, C., Lazowska, J., Michel, F., Casey, J., Getz, J., Locker, J., Rabinowitz, M., Bolotin-Fukuhara, Coen, D., Deutsch, B., Dujon, P., Netter P. and Slonimski, P.P. (1973). "Mitochondrial nucleic acids in the petite colonie mutants: deletions and repetitions of genes".
Biochimie **55**: 779-792.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity".
Anal. Biochem. **132**: 6-13.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein B. (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity".
Addendum Anal. Biochem. **137**: 266-267.

- Ferrero, I., Rossi, C., Landini, M.P. and Puglisi, P.P. (1978). "Role of the mitochondrial protein synthesis in the catabolite repression of the petite-negative yeast *K. lactis*". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**: 340-348.
- Forsburg, S.L. and Guarente, L. (1989a). "Communication between mitochondria and the nucleus in regulation of cytochrome genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**: 153-80.
- Forsburg, S.L. and Guarente, L. (1989b). "Identification and characterization of *HAP4*: a third component of the CCAAT-bound *HAP2/HAP3* heteromer". *Genes Dev.* **3**: 1166-1178.
- Fournier, A., Flier, R., Yeh, P. and Mayaux, J.F. (1989). "The primary structure of the 3-phosphoglycerate kinase (PGK) gene from *Kluyveromyces lactis*". *Nucleic Acids Res.* **18**: 365.
- Freire Picos, M.A., Rodríguez Torres A.M., Ramil, E., Cerdán, M.E., Breunig, K.D., Hollenberg, C.P. and Zitomer, R.S. (1993). "Sequence of a cytochrome *c* gene from *Kluyveromyces lactis* and its upstream region". *Yeast* **9**: 201-204.
- Fukasawa, T. and Nogi Y. (1989). "Molecular genetics of galactose metabolism in yeast". En "Yeast genetic engineering". Ed. P. Barr, A. Brake and Valenzuela, P. Butterworths publishers. Boston. Págs. 65-82.
- Furter-Graves, E.M. and Hall, B.D. (1990). "DNA sequence elements required for transcription initiation of the *Schizosaccharomyces pombe* gene in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Gen. Genet.* **223**: 407-416.
- Fytlovich, S., Gervais, M., Agrimonti, C. and Guiard, B. (1993). "Evidence for a interaction between the CYP1(*HAP1*) activator and a cellular factor during heme-dependent transcriptional regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *EMBO J.* **12**: 1209-1218.
- Gamo, F.J., Portillo, F. and Gancedo, C. (1993). "Characterization of mutations that overcome the toxic effect of glucose on phosphoglucose isomerase less strains of *Saccharomyces cerevisiae*". *FEMS Microbiol. Lett.* **106**: 233-238.
- Gancedo, J.M., and Gancedo, C. (1971). "Fructose-1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from fermenting and non fermenting yeast". *Arch. Microbiol.* **76**: 132-138.
- Gancedo, J.M., and Gancedo, C. (1986). "Catabolite repression mutants of yeast". *FEMS Microbiol. Lett.* **32**: 179-178.

- Gancedo, C. and Serrano, R. (1989). "Energy-yielding metabolism". En "The Yeast". Ed. Rose A.H. and Harrison J.S. Academic Press. London. Vol 3 Págs. 205-259.
- Gancedo, J.M. (1992). "Carbon catabolite repression in yeast".
Eur. J. Biochem. **206**: 297-313.
- Georgakopoulos, T. and Thireos, G. (1992). "Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the *GCN5* protein to promote normal levels of transcription".
EMBO J. **11**: 4145-4152.
- Gietz, R.D. and Sugino, A. (1988). "*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking restriction sites".
Gene **74**: 527-534.
- Goffrini, P., Algeri, A.A., Donnini, C., Wésolowski-Louvel, M. and Ferrero, I. (1989). "*RAG1* and *RAG2*: nuclear genes involved in the dependence/independence on mitochondrial respiratory function for growth on sugars".
Yeast **5**: 99-106.
- Goffrini, P., Wésolowski-Louvel, M., Ferrero, I. and Fukuhara, H. (1990). "*RAG1* gene of the yeast *Kluyveromyces lactis* codes for a sugar transporter".
Nucleic Acids Res. **18**: 5294.
- Goffrini, P., Wésolowski-Louvel, M. and Ferrero, I. (1991). "A phosphoglucose isomerase gene is involved in the Rag phenotype of the yeast *Kluyveromyces lactis*".
Mol. Gen. Genet. **288**: 401-409.
- Gouy, M. and Gautier, C. (1982). "Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity".
Nucleic Acids Res. **10**: 7055-7074.
- Grantham, R., Gautier, C., Gouy, M., Mercier, R. and Pave, A. (1980). "Codon catalog usage and the genome hypothesis".
Nucleic Acids Res. **8**: 49-53.
- Grantham, R., Gautier, C., Gouy, M., Jacobzone, M. and Mercier, R. (1981). Codon catalog usage is a genome strategie modulated for gene expressivity.
Nucleic Acids Res. **9**: r43-r74.
- Guarente, L. and Mason, T. (1983). "Heme regulates the transcription of the *CYC1* gene of *S. cerevisiae* via an upstream activation site".
Cell **32**: 1279-1286.
- Guarente, L., Lalonde, P., Gifford, P. and Alani, E. (1984). "Distinctly regulated tandem upstream activation sites mediate catabolite repression of the *CYC1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*".
Cell **36**: 503-511.

- Guérin, B. (1991). "Mitochondria". En "The Yeast". Ed. Rose A.H. and Harrison J.S. Academic Press. London. Vol 4. Págs. 541-589.
- Hahn, S., Pinkham, J., Wei, R., Miller, R. and Guarente, L. (1988). "The *HAP3* regulatory locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes divergent overlapping transcripts". Mol. Cell. Biol. 8: 655-663.
- Hampsey, D. M., Das, G. and Sherman, F. (1986). "Amino acid replacements in yeasts iso-1-cytochrome c". J. Biol. Chem. 261: 3259-3271.
- Hampsey, D.M., Das, G. and Sherman, F. (1988). "Yeast iso-1-cytochrome c: genetic analysis of structural requirements". FEBS Lett. 231: 275-283.
- Hanahan, H. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids". J. Mol. Biol. 166: 557-780.
- Heinikoff, S. and Cohen, E.H. (1984). "Sequences responsible for transcription termination on a gene segment in *Saccharomyces cerevisiae*". Mol. Cell. Biol. 4: 1515-1520.
- Heinish, J., Kirchart, L., Liesen, T., Vogelsang, K. and Hollenberg C.P. (1993). "Molecular genetics of phosphofructokinase in the yeast *Kluyveromyces lactis*". Mol. Microbiol. 8: 559-570.
- Herrick, D., Parker, R. and Jacobson, A. (1990). "Identification and comparison of stable and unstable mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*". Mol. Cell. Biol. 10: 2269-2284.
- Hinnenbush, A.G. (1990). "Involvement of an initiation factor and protein phosphorylation in translational control of *GCN4* mRNA". Trends Biol. Sci. 15: 148-152.
- Holzer, H. (1976). "Catabolite inactivation in yeast". TIBS 1: 178-81.
- Hope, I.A. and Struhl, K. (1985). "*GCN4* protein, synthesized *in vitro*, binds *HIS3* regulatory sequences: implications for general control of amino acid biosynthetic genes in yeast". Cell 43: 177-188.
- Huynh, T.V., Young, R.A. and Davis, R.W. (1985). En "DNA cloning". Ed. Glover, D.M. IRL Press Limited. Oxford. Vol. 1.
- Ikemura, T. (1982). "Correlation between the abundance of yeast tRNAs and the occurrence of the respective codons in protein genes". J. Mol. Biol. 158: 573-597.

- Ikemura, T. (1985). "Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms".
Mol. Biol. Evol. **2**: 13-34.
- Johnson, P.F. and McKnight S.L. (1989). "Eukaryotic transcriptional regulatory proteins".
Annu. Rev. Biochem. **58**: 799-839.
- Jong, S.C. and Edwards, M.L.S. (Eds). (1990) "American Type Culture Collection Catalogue of Yeasts". 18th ed. Rockville, M.D. Pág. 39.
- Kemmerer, E.C., Lei, M. and Wu, R. (1991). "Structure and molecular evolutionary analysis of a plant gene: surprising implications for *Arabidopsis thaliana*".
J. Mol. Evol. **32**: 227-237.
- Keilin, D (1930). " Cytochrome and intracellular oxidase"
Proc. R. Soc. London **B106**: 418-444
- Keleher, C.A., Redd, M.J., Schultz, J., Carlson, M. and Johnson, J.D. (1992). "*SSN6-TUP1*, is a general repressor of transcription in yeast".
Cell **68**: 709-719.
- Klebe, R.J., Harris, J.V., Sharp, Z.D. and Douglas, M.G. (1983). "A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast".
Gene **25**: 333-341.
- Kotula, L. and Curtis, J. (1991). "Evaluation of foreign gene codon optimization in yeast: expression of a mouse Ig Kappa chain".
Bio/Technology **9**: 1386-1389.
- Lalonde, B., Arcangioli, B. and Guarente, L. (1986). "A single *Saccharomyces cerevisiae* upstream activation site (UAS1) has two distinct regions essential for its activity".
Mol. Cell. Biol. **6**: 4690-4696.
- Larson, G.P. and Rossi, J.J. (1991). "Altered response to growth rate changes in *Kluyveromyces lactis* versus *Saccharomyces cerevisiae* as demonstrated by heterologous expression of ribosomal protein 59 (*CRY1*)".
Nucleic Acids Res. **19**: 4701-4707.
- Laz, T., Clements, J. and Sherman, F. (1987). "The role of messenger RNA sequences and structures in eukaryotic translation". En "Translational regulation of gene expression". Ed. Ilan J. Plenum Press. New York. Págs. 413-427.
- Lewis, M.J., Sweet, D.J. and Pelham, H.R.B. (1990). " The *ERD2* gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system".
Cell **61**: 1359-1363.

- Liao, X., Small, W.C., Srere, P.A. and Butow, R.A. (1991). "Intramitochondrial functions regulate nonmitochondrial citrate synthase (*CIT2*) expression in *Saccharomyces cerevisiae*".
Mol. Cell. Biol. **11**: 38-46.
- Liao, X., and Butow, R. (1993). "*RTG1* and *RTG2*: two yeast Genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus".
Cell **72**: 61-71.
- Lloyd, A.T. and Sharp, P.M. (1992). "Evolution of codon usage patterns: the extent and nature of divergence between *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*".
Nucleic Acids Res. **20**: 5289-5295.
- Lombardo, A., Cereghino, G.P. and Scheffler, I. (1992). "Control of mRNA turnover as a mechanism of glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*".
Mol. Cell. Biol. **12**: 2941-2948.
- Losson, R. and Lacroute, F. (1979). "Interference of nonsense mutations with eukaryotic messenger RNA stability".
Proc. Acad. Sci. USA **76**: 5134-5137.
- Lowry, C.V., Weiss, J.L., Walthall, A. and Zitomer, R.S. (1983). "Modulator sequences mediate oxygen regulation of *CYC1* and neighbouring gene in Yeast".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**: 151-155.
- Lowry, C.V. and Zitomer, R.S. (1984). "Oxygen regulation of anaerobic and aerobic genes by a common factor in yeast".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**: 6129-6133.
- Lowry C.V. and Leiber, R.H. (1986). "Negative regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* gene by heme as mediated by the *ROX1* gene product".
Mol. Cell. Biol. **6**: 4145-4148.
- Lowry, C.V. and Zitomer, R.S. (1988). "*ROX1* encodes an heme-induced repression factor regulating *ANB1* and *CYC7* of *Saccharomyces cerevisiae*".
Mol. Cell. Biol. **8**: 4651-4658.
- Lowry, C.V., Cerdán, M.E. and Zitomer, R.S. (1990). "A hypoxic consensus operator and a constitutive activation region regulate the *ANB1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*".
Mol. Cell. Biol. **10**: 5921-5926.
- Mager, W-H. and Moradas Ferreira, P. (1993). "Stress response of yeast".
Biochem. J. **290**: 1-13.
- Mazzoni, C., Saliola, M. and Falcone C. (1992). "Ethanol-induced and glucose-insensitive alcohol dehydrogenase activity in the yeast *Kluyveromyces lactis*".
Mol. Microbiol. **6**: 2279-2286.

- McNeil, J.B. and Smith M. (1985). "*Saccharomyces cerevisiae* CYC1 mRNA 5'-end positioning: Analysis by *in vitro* mutagenesis, using synthetic duplexes with random mismatch base pairs".
Mol. Cell. Biol. 5: 3545-3551.
- McNeill, J.B. and Smith M. (1986). "Transcriptional initiation of the *Saccharomyces cerevisiae* iso-1-cytochrome *c* gene. Multiple, independent TATA sequences".
J. Mol. Biol. 187: 363-378.
- McNeill, J.B. (1988). "Functional characterization of a pyrimidine-rich element in the 5' noncoding region of the yeast iso-1-cytochrome *c* gene".
Mol. Cell. Biol. 8: 1045-1054.
- Messing, J. (1979). "A multipurpose cloning system based on single-stranded DNA bacteriophage M13".
Recomb. DNA Tech. Bull. 2: 43
- Mitchell P.J. and Tjian, R. (1989). "Transcriptional Regulation in Mammalian Cells by sequence-specific DNA binding proteins".
Science 245: 371-378.
- Montgomery, D.L., Leung, D.W., Smith, M., Shalit, P., Faye, G. and Hall, B.D. (1980). "Isolation and sequence of the gene for iso-2-cytochrome *c* in *Saccharomyces cerevisiae*".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 541-545.
- Na, J.G. and Hampsey, M. (1993). "The *Kluyveromyces* gene encoding the general transcription factor IIB: structural analysis and expression in *Saccharomyces cerevisiae*".
Nucleic Acids Res. 15: 3413-3417.
- Nehlin, J.O. and Ronne, H. (1990). "Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilm'tumor binding proteins".
EMBO J. 9: 2891-2898.
- Neupert, W., Hartl, F.U., Craig, E.A. and Pfanner, N. (1990). "How do polypeptides cross the mitochondrial membranes?".
Cell 63: 447-450.
- Nicholson, D.W. and Neupert, W. (1989). "Import of cytochrome *c* into mitochondria: reduction of heme, mediated by NADH and flavin nucleotides, is obligatory for its covalent linkage to apocytochrome *c*".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 4340-4344.
- Nieuwint, R.T.M., Mager, W.H., Maurer, K.C.T. and Planta, R.J. (1989). "Mutational analysis of the upstream activation site of yeast ribosomal protein genes".
Curr. Genet. 15: 247-251.

- Nye, S.H. and Scarpulla, R.C. (1990). "In vivo expression and mitochondrial targeting of yeast apoiso-1-cytochrome *c* fusion proteins".
Mol. Cell. Biol. **10**: 5753-5762.
- Olesen, J.T., Hahn, S. and Guarente, L. (1987). "Yeast *HAP2* and *HAP3* activators both bind to the *CYC1* upstream activation site UAS2 in an interdependent manner".
Cell **51**: 953-961.
- Olesen, J.T., Fikes, J.D. and Guarente, L. (1991). "The *Schizosaccharomyces pombe* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* *HAP2* reveals selective and stringent conservation of the small essential core protein domain".
Mol. Cell. Biol. **11**: 611-619.
- Oliver, S.G. and Warmington, J.R. (1989). "Transcription". En "The Yeasts". Ed. Rose A.H. and Harrison J.S. Academic Press. London. Vol 3. Págs.117-160.
- Osborne, B.I. and Guarente, L. (1989). "Mutational analysis of a yeast transcriptional terminator".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 4097-4101.
- Ortiz, C.H., Maia, J.C.C., Tenan, M.N., Braz-Padiao, G.R., Mattoon, J.R. and Panek A.D. (1983). "Regulation of yeast trehalase by a monocyclic, cyclic AMP-dependent phosphorylation-dephosphorylation cascade system".
J. Bacteriol. **153**: 644-651.
- Padmanaban, G., Venkateswar, V. and Rangajaran, P.N. (1989). "Haem as multifunctional regulator".
TIBS **14**: 492-496.
- Pearce, D. and Sherman, F. (1992). "*CYC12* controls the protease that specifically degrades apo-iso-1-cytochrome *c*".
Yeast **8**: S479.
- Pfeifer, K., Prezant, T. and Guarente, L. (1987a). "Yeast *HAP1* activator binds to two upstream sites of different sequences".
Cell **49**: 19-27.
- Pfeifer, K., Arcangioli, B. and Guarente, L. (1987b). "Yeast *HAP1* activator competes with the factor *RC2* for binding to the upstream activation site UAS1 of the *CYC1* gene".
Cell **49**: 9-18.
- Pfeifer, K., Kim, K.S., Kogan, S. and Guarente, L. (1989). "Functional dissection and sequence of the yeast *HAP1* activator".
Cell **56**: 291-301.
- Pillar T.M. and Bradshaw, R.E. (1991). "Heat shock and stationary phase induce transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* iso-2 cytochrome *c* gene".
Curr. Genet. **20**: 185-188.

- Pinkham, J.L. and Guarente, L. (1985). "Cloning and molecular analysis of the *HAP2* locus: A global regulator of respiratory genes in *Saccharomyces cerevisiae*".
Mol. Cell. Biol. **5**: 3410-3416.
- Pinkham, J.L., Olesen, J.T. and Guarente, L. (1987). "Sequence and nuclear localization of the *Saccharomyces cerevisiae* HAP2 protein, a transcriptional activator".
Mol Cell Biol. **7**: 578-585.
- Pinto, I., Ware, D.E. and Hampsey, M. (1992). "The yeast *SUA7* gene encodes a homolog of human transcription initiation factor TFIIB and is required for normal start site selection in vivo".
Cell **68**: 977-988.
- Plaat, J.B., van der (1974). "Cyclic 3',5'-adenosine mono-phosphate stimulates trehalose degradation in bakers' yeast".
Biochem. Biophys. Res. Comm. **56**: 580-587.
- Poch, O., L'Hote, H., Dallery, V., Debeaux, F., Fleer, R. and Sodoyer, R. (1992).
"Sequence of the *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase: comparison with prokaryotic enzymes and secondary structure analysis".
Gene **118**: 55-63.
- Poyton, R.O. and Burke, P. (1992). "Oxygen regulated transcription of cytochrome *c* and cytochrome oxidase genes in yeast".
Biochimica et Biophysica Acta. **1101**: 252-256.
- Romanos, M.A., Scorer, C.A. and Clare, J.J. (1992). "Foreign gene expression in yeast: a review".
Yeast **8**: 423-488.
- Rosenblum-Vos L.S., Rhodes, L., Evangelista, C.C., Boayke K.A., Wick, P. and Zitomer, R.S. (1991). "The *ROX3* gene encodes an essential nuclear protein involved in *CYC7* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*".
Mol. Cell. Biol. **11**: 5639-5647.
- Russell, P.R. and Hall, B.D. (1982). "Structure of the *Schizosaccharomyces pombe* cytochrome *c* gene".
Mol. Cell. Biol. **2**: 106-116.
- Russo, P., Li, W-Z., Hampsey, D.M., Zaret, K.S. and Sherman, F. (1991). "Distinct *cis*-acting signals enhance 3' end-point formation of *CYC1* mRNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*".
EMBO J. **10**: 563-571.
- Sabová, L., Zeman, I., Supek, F. and Koralov, J. (1993). "Transcriptional control of *AAC3* gene encoding mitochondrial ADP/ATP translocator in *Saccharomyces cerevisiae* by oxygen, heme and ROX1 factor".
Eur. J. Biochem. **231**: 547-553.

- Salama, S.R., Cleves, A.E., Malehorn, D.E., Whitters, E.A. and Bankaitis, V.A. (1990). "Cloning and characterization of *Kluyveromyces lactis* SEC14, a gene whose product stimulates Golgi secretory function in *Saccharomyces cerevisiae*". J. Bacteriol. **172**: 4510-4521.
- Saliola, M., Shuster, J.R. and Falcone, C. (1990). "The alcohol dehydrogenase system in the yeast *Kluyveromyces lactis*". Yeast **6**: 193-204.
- Saliola, M., Gonnella, R., Mazzoni, C. and Falcone, C. (1991). "Two genes encoding putative mitochondrial alcohol dehydrogenases are present in the yeast *Kluyveromyces lactis*". Yeast **7**: 391-400.
- Salmeron, J.M. and Johnston, S.A. (1986). "Analysis of the *Kluyveromyces lactis* positive regulatory gene *LAC9* reveals functional homology to, but sequence divergence from, the *Saccharomyces cerevisiae* *GAL4* gene". Nucleic Acids Res. **14**: 7767-7781.
- Sambrook, J., Maniatis, T. and Fritsch, E. F. (1982). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harborg Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, S. A. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 5463-5467.
- Sawadogo, M. and Sentenac A. (1990). "RNA polymerase B (II) and general transcription factors". Annu. Rev. Biochem. **59**: 711-754.
- Scorer, C.A., Carrier, M.J. and Rosenberg, R.F. (1991). "Amino acid misincorporation during high-level expression of mouse epidermal growth factor in *Escherichia coli*". Nucleic Acids Res. **19**: 3511-5316.
- Shain, D.H., Salvatore, C.H. and Denis, L. (1992). "Evolution of the alcohol dehydrogenase (ADH) genes in yeast: characterization of a fourth ADH in *Kluyveromyces lactis*". Mol. Gen. Genet. **232**: 479-488.
- Sharp, P.M., Tuohy, T.M.F. and Mosurski, K.R. (1986). "Codon usage in yeast, cluster analysis clearly differentiates between highly and lowly expressed genes". Nucleic Acids Res. **14**: 5125-5143.
- Sharp, P.M., Cowe, E., Higgings, D.G., Shields, D.C., Wolfe, K.H. and Wright, F. (1988). "Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity". Nucleic Acids Res. **16**: 8207-8211.

- Sharp, P.M. and Cowe, E. (1991). "Synonymous codon usage in *Saccharomyces cerevisiae*".
Yeast 7: 657-678.
- Sherman, F., Stewart, J.W. and Tsunasawa, S. (1985). "Metionine or not metionine at the beginning of a protein".
BioEssays 3: 27-31.
- Sherman, F. (1990). "Studies of yeast cytochrome *c*: how and why they started and why they continued".
Genetics 125: 9-12.
- Shuster, J.R., Moyer, D. and Irvine, B. (1987). "Sequence of the *Kluyveromyces lactis* *URA3* gene".
Nucleic Acids Res. 15: 8573.
- Shuster, J.R. (1990). "*Kluyveromyces lactis* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase-1 genes are linked and divergently transcribed".
Nucleic Acids Res. 18: 4271.
- Sierkstra, L.N., Nouwen, N.P., Verbakel, J.M.A. and Verrips, C.T. (1992). "Analysis of glucose repression in *S. cerevisiae* by pulsing glucose to galactose-limited continuous culture".
Yeast 8: 1077-1087.
- Siso, M.I.G., Cerdán, M.E., Picos, M.A.F., Ramil, E., Belmonte, E.R. and Torres, A.R. (1992). "Permeabilization of *Kluyveromyces lactis* cells for milk whey saccharification: a comparison of different treatments".
Biotechnol. Techniques 6: 289-292.
- Smith, M., Leung, D.W., Gillam, S., Astell, C.R., Montgomery, D.L. and Hall, B.D. (1979). "Sequence of the gene for iso-1-cytochrome *c* in *S. cerevisiae*".
Cell 16: 753-761.
- Sousa, R. and Arcangioli, B. (1989). "A point mutation in the *CYC1* *URA3* creates a new combination of regulatory elements that activate transcription synergistically".
EMBO J. 8: 1801-1808.
- Southern, E.M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis".
J. Mol. Biol. 98: 503-517.
- Stark, M.J.R. and Milner, S.S. (1989). "Cloning and Analysis of the *Kluyveromyces lactis* *TRP1* gene: a Chromosomal locus flanked by genes encoding Inorganic Pyrophosphatase and Histone H3".
Yeast 5: 35-50.
- Struhl, K. (1989). "Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast".
Annu. Rev. Biochem. 58: 1051-1077.

- Stuart, R.A., Nicholson, D.W., Wienhues, U. and Neupert, W. (1990). "Import of apocytochrome *c* into mitochondrial intermembrane space along a cytochrome *c*1 sorting pathway".
J. Biol. Chem. **33**: 20210-20219.
- Swanson, M.S., Zieminn, S.M., Miller, D.D., Garber, E.A.E. and Margoliash, E. (1985). "Developmental expression of nuclear genes that encode mitochondrial proteins: Insect cytochromes *c*".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 1964-1968.
- Tanguy-Rongeau, C., Wésolowski-Louvel, M. and Fukuhara, H. (1988). "The *Kluyveromyces lactis* *KEX1* gene encodes a subtilisin-type serine proteinase".
FEBS Lett. **234**: 464-470.
- Thireos, G., Penn, M.D. and Greer, H. (1984). "5' untranslated sequences are required for translationally control of a yeast regulatory gene".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**: 5096-5100.
- Ticher, A. and Graur, D. (1989). "Nucleic acid composition, codon usage and the rate of synonymous substitution in protein-coding genes".
J. Mol. Evol. **28**: 286-298.
- Turcott, B. and Guarente, L. (1992). "HAP1 positive control mutants specific for one of two binding sites".
Genes and Development **6**: 2001-2009.
- Turi, T.G. and Loper J.C. (1992). "Multiple regulatory elements control expression of the gene encoding the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome P450 lanosterol 14- α -demethylase (*ERG11*)".
J. Biol. Chem. **261**: 2046-2056.
- Trueblood, C.E., Wright R.M. and Poyton R.O. (1988). "Differential regulation of the cytochrome *c* oxidase subunit V multigene family by heme and the *HAP2* and *REO1* genes".
Mol. Cell. Biol. **8**: 4537-4540.
- Trumbly, R.J. (1992). "Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*".
Mol. Microbiol. **6**: 15-21.
- Tzagoloff, A. and Dieckermann C.L. (1990). "*PET* genes of *Saccharomyces cerevisiae*".
Microbiol. Rev. **54**: 211-225.
- Verdiere, J., Gaisne, B., Guiard, B., Defranoux, N. and Slonimski, P.P. (1988). "CYP1 (*HAP1*) regulator of oxygen-dependent gene expression in yeast. 2. Missense mutation suggests alternative Zn fingers as discriminating agents of gene control".
J. Mol. Biol. **204**: 277-282.

- Verdiere, J., Gaisne, M. and Labbe-Bois, R. (1991). "*CYP1 (HAP1)* is a determinant effector of alternative expression of heme-dependent transcription in yeast". *Mol. Gen. Genet.* **228**: 300-306.
- Wada, K. Wada, Y., Ishibashi, F., Gojobori, T. and Ikemura, T. (1992). "Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data". *Nucleic Acids Res.* **20**: 2111-2118.
- Walker-Jonah, A. (1988). "Studies on the regulation of lactose utilization in the yeast *Kluyveromyces lactis*". Tesis Doctoral, Universidad de Düsseldorf.
- Webster, T.D. and Dickson R.C. (1988). "Nucleotide sequence of the galactose gene cluster of *Kluyveromyces lactis*". *Nucleic Acids Res.* **16**: 8192-8194.
- Werner, M., Feller, A., Delbecq, P. and Pierad, A. (1990). "Translational control by Arginine of yeast gene CPA1". En "Post-transcriptional control of gene expression". Ed. J.E.G. McCarthy, Tuite, M.E. Springer Verlag. Berlin. Págs. 337-346.
- Wésolowski-Louvel, M., Goffrini, P. and Ferrero, I. (1988). "The *RAG2* gene of the yeast *Kluyveromyces lactis* codes for a putative Phosphoglucose Isomerase". *Nucleic Acids Res.* **16**: 8714.
- Wésolowski-Louvel, M. Goffrini, P., Ferrero, I. and Fukuhara, H. (1992a). "Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. I Properties of an inducible low-affinity glucose transporter gene". *Mol. Gen. Genet.* **233**: 89-96.
- Wésolowski-Louvel, M., Prior, C., Bornecque, D. and Fukuhara, H. (1992b). "Rag⁻ mutations involved in glucose metabolism in Yeast: isolation and genetic characterization". *Yeast* **8**: 711-719.
- Williams, B.L. y Wilson K. (1981). "Principios y técnicas de bioquímica experimental" Ed. Omega. Barcelona.
- Williams, F.E., Varanasi, U., and Trumbly, R.J (1991). "The CYC8 and TUP1 proteins involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* are associated in a protein complex". *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3307-3316.
- Wright, F. (1990). "The *effective number of codons* used in a gene". *Gene* **87**: 23-29.

- Wright, C.F. and Zitomer, R.S. (1984). "A positive regulatory site and a negative regulatory site control the expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *CYC7* gene".
Mol. Cell Biol. 4: 2023-2030.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors".
Gene 33: 103-119.
- Zang, M., Rosenblum-Vos, L.S., Lowry, C.V., Boayke K.A. and Zitomer, R.S. (1991). "A yeast protein with homology to the b-subunit of G proteins is involved in control of heme-regulated and catabolite-repressed genes".
Gene 97: 153-161.
- Zang, Y.P., Chen, X.J., Li, Y.Y. and Fukuhara, H. (1992). "*LEU2* gene homolog in *Kluyveromyces lactis*".
Yeast 8: 801-804.
- Zaret, K.S. and Sherman, F. (1982). "DNA sequence required for efficient transcription in yeast".
Cell 28: 563-573.
- Zaror, I., Marcus, F., Moyer, D.L., Tung, J. and Shuster, J. (1993). "Fructose-1,6-biphosphatase of the yeast *Kluyveromyces lactis*".
Eur. J. Biochem. 212: 193-199.
- Zitomer, R.S. and Hall, B.D. (1976). "Yeast cytochrome *c* messenger RNA *in vitro* translation and specific immunoprecipitation of the *CYC1* gene product".
J. Biol. Chem. 251: 6320-6326.
- Zitomer, R.S., Montgomery, D.L., Nichols, D.L. and Hall, B.D. (1979). "Transcriptional regulation of the yeast cytochrome *c* gene".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3627-3631.
- Zitomer, R.S. and Sellers, J.W., McCarter, D.W., Hastings, P.A., Wick, P. and Lowry, C.V. (1987). "Elements involved in oxygen regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *CYC7* gene".
Mol. Cell Biol. 7: 2212-2220.
- Zitomer, R.S. and Lowry, C.V. (1992). "Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*".
Microbiol. Rev. 56: 1-11.

APÉNDICES

Apéndice I

Plásmidos contruídos para subclonar *KICYC1*:

pEC1: clon inicial. Fragmento de 9,8 kb clonado en el vector YEpl24 que complementa la línea AH10 de *S. cerevisiae* (deficiente en citocromos).

pAF1: contruído por eliminación del fragmento *BamHI-BamHI* (1500pb) de pEC1 y posterior auto-ligado del pásmido.

pAF2: procedente de la eliminación del fragmento *SaII-SaII* (2000 pb) de pEC1 En la misma orientación que el anterior.

pAF3: fragmento de 1500 pb, procedente de la digestión total con *SaII* de pEC1 y autoligado del vector conteniendo la porción restante del inserto.

pART1: fragmento *BamHI-SaII* (4000 pb) de pAF2 y subclonado en el MCS de YEplac112. En la orientación *BamHI-SaII*. Complementa líneas deficientes en citocromo *c*.

Plásmidos utilizados para la secuenciación de *KICYC1*:

La serie de contrucciones que se cita a continuación, se realizó en el *polilinker* del vector YEplac112 con el propósito de secuenciar el gen *KICYC1*.

pART10: fragmento *PstI-PstI* de 1900 pb de pART1 en *PstI* del MCS de YEplac112. Al cortar con *PstI* se originan dos fragmentos de igual tamaño, pero se ha subclonado el que complementa líneas de *Saccharomyces* deficientes en citocromo *c*.

pART6 (subclón de pART10): fragmento de 600 pb que resulta de la eliminación del fragmento *HindIII-HindIII* de pART10. Tiene la misma orientación que pART10. Comprende la totalidad de la región upstream contenida en el subclón pART10 y una pequeña parte de la región codificadora; no complementa a líneas deficientes en citocromo *c*.

pART8 (subclón de pART10): fragmento *HindIII-HindIII* de pART10 de 1200 pb incluido en el sitio *HindIII* del MCS de YEplac112. Tiene orientación inversa a la de pART10. Contiene la región codificadora a partir del sitio *HindIII* (por tanto incompleta) y no complementa líneas de *Saccharomyces* deficientes en citocromo *c*.

pART1/10: fragmento *PstI-PstI* de pART10 pero con orientación contraria en el MCS. Se ha utilizado en la construcción de pART1/6.

pART1/6: fragmento *HindIII-HindIII* de pART1/10 subclonado en el sitio *HindIII* del MCS de YEplac112. Orientación inversa a pART6.

pART1/8: pART8 cortado con *HindIII* y auto-ligado seleccionada la orientación contraria a pART8.

pART7: fragmento *KpnI-SphI* de pART10 en el sitio *KpnI-SphI* de YEplac112.

Apéndice II

Reactivos:

Acetato sódico anhidro
 Acetato potásico
 Acido acético glacial
 Acido bórico
 Acido clorhídrico
 Acido fólico
 Acido láctico
 Acido maléico
 Acido p-aminobenzoico
 Acrilamida
 Adenina
 Agarosa
 Alcohol isoamílico
 Ampicilina
 Arginina
 Azul de bromofenol
 Bacto-Agar
 Bacto-Peptona
 Bacto-Triptona
 Bacto-Yeast-Extract
 Bicina
 Biotina
 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil- β -D galactosido (X-Gal)
 Bromuro de etidio
 Casaminoácidos
 Citrato trisódico dihidratado
 Cloruro amónico
 Cloruro cálcico
 Cloruro de cesio
 Cloruro férrico
 Cloruro sódico
 Cloruro de Litio
 Cloruro de magnesio
 Cloruro potásico
 Cloranfenicol
 Cloroformo
 dATP ($\alpha^{32}\text{P}$)
 dATP ($\gamma^{32}\text{P}$)
 Dextrosa
 Dicloro-dimetil-silano
 Dietil-Pirocarbonato (DEPC)
 Dimetil-Formamida
 Dimetil-Sulfósido (DMSO)
 Dithiothreitol (DTT)
 DNA de salmón
 EDTA
 Ergosterol
 Etanol
 Etilen Glicol
 Fenilalanina

Referencia:

Merk (6268)
 Sigma (S-1147)
 Merk (62)
 Sigma (B-0252)
 Merk (317)
 Sigma (F-7876)
 Sigma (L-2000)
 Fluka (63180)
 Sigma (A-9878)
 Sigma (A-8887)
 Sigma (A-8626)
 Sigma (A-9539)
 Merk (983)
 Sigma (A-9518)
 Sigma (A-5006)
 Merk (8122)
 Difco (0140-01)
 Difco (0118-01-8)
 Difco (0123-01)
 Difco (0127-01)
 Sigma (B-3876)
 Sigma (B-4501)
 Sigma (B-9146)
 Merk (11615)
 Difco (0230-01-1)
 Merk (6448)
 Sigma (A-0171)
 Sigma (C-3881)
 Sigma (C-4036)
 Panreac (141358)
 Merk (6404)
 Sigma (L-0505)
 Sigma (M-8266)
 Sigma (P-4504)
 Sigma (C-0378)
 Merk (2445)
 Ammersham
 Ammersham
 Difco (0155-17-4)
 Merk (803452)
 Sigma (D-5758)
 Sigma (D-4253)
 Sigma (D-5879)
 Sigma (D-9779)
 Sigma (D-1626)
 Sigma (E-5134)
 Sigma (E-6510)
 Merk (983)
 Sigma (E-9129)
 Sigma (P-2126)

Fenol	Merk (206)
Ficoll	Sigma (F-2637)
Formaldehído	Merk (4003)
Formamida	Merk (9684)
Fosfatasa alcalina	Boehringer (713023)
Fosfato monopotásico	Merk (4873)
Fosfato monosódico	Sigma (S-0751)
Fosfato disódico	Merk (507)
Gas-Pack (generador de anaerobiosis)	Biomerieux (96120)
Glicerol	Sigma (G-7757)
Hemina	Sigma (H-2250)
Hidróxido sódico	Merk (500)
Histidina	Sigma (H-8125)
Inositol	Sigma (I-5125)
Ioduro potásico	Sigma (P-8256)
Isoleucina	Sigma (I-2752)
Isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG)	Sigma (I-5502)
Kit de <i>Gene-Clean</i>	Bio101 (3105)
Kit de marcaje y detección no radiactivo con digoxigenina	Boehringer (1093657)
Kit de purificación de mRNA	Pharmacia (27-9258-01)
<i>Klenow Enzyme</i>	Boehringer (1008404)
Leucina	Sigma (L-8000)
Lisina	Sigma (L-5626)
Lisozima	Sigma (L-6876)
Marcador III de pesos moleculares de DNA	Boehringer (528552)
Marcador I de pesos moleculares de RNA	Boehringer (1062611)
β -Mercaptoetanol	Merk (15433)
Metionina	Sigma (M-9625)
Molibdato sódico	Sigma (M-1003)
MOPS	Sigma (M-9381)
Niacina	Sigma (N-4126)
Nitrato de Plata	Merk (1510)
Nitrógeno (gaseoso)	Carburos Metálicos
Nucleasa S1	Boehringer (818330)
Nucleótidos dNTPs y ddNTPs	Boehringer
Pantotenato cálcico	Sigma (P-2250)
Piridoxina	Sigma (P-9755)
Polinucleótido Kinasa	Boehringer (174645)
PEG 1000 (Polietilén glicol)	Sigma (P-3515)
<i>Primer reverse</i>	Boehringer (1010093)
<i>Primer universal</i>	Boehringer (1010077)
PVP-360 (Polivinil pirrolidona)	Sigma (P-2139)
Riboflavina	Sigma (R-4500)
Ribonucleasa A	Sigma (R-5503)
Sacarosa	Fluka (84100)
Sarcosil (N-Lauril-Sarcosina)	Sigma (L-5125)
Sephadex G-50	Pharmacia (17-0042-01)
Seroalbúmina bovina (BSA), fracción V	Boehringer (775827)
SDS (Dodecil sulfato sódico)	Sigma (L-4509)
Sorbitol	Sigma (S-1876)
Sulfato amónico	Probus (021720)
Sulfato cúprico	Sigma (F-61240)
Sulfato de dextrano	Sigma (D-8906)
Sulfato ferroso	Merck (3965)
Sulfato magnésico	Sigma (M-1880)
Sulfato manganoso	Sigma (M-7634)
Sulfato de zinc	Sigma (Z-4750)
T7 DNA Polimerasa (Sequenase)	USB (70775)

Tiamina
Timina
Tirosina
Treonina
Triptófano
Tris
Triton X-100
Tween 80
Uracilo
Urea
Uridina
Xilen Cianol
Zimolasa

Sigma (T-4625)
Sigma (T-0895)
Sigma (T-3754)
Sigma (T-8375)
Sigma (T-0254)
Boehringer (708976)
Sigma (T-6878)
Sigma (P-1754)
Sigma (U-07750)
Sigma (U-1250)
Sigma (U-3003)
Bio-Rad (161-0423)
Sigma (L-8012)

3681

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Servicio de Bibliotecas



1700744359